

Funktionale Nanopartikel auf der Basis von Cellulose

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)



**FRIEDRICH-SCHILLER-
UNIVERSITÄT
JENA**

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Chemiker Peter Schulze
geboren am 03. Juni 1989 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Heinze (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. Felix Schacher (Friedrich-Schiller-Universität Jena)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 26.05.2020

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungs- und Symbolverzeichnis	xv
1. Einleitung und Zielstellung	1
I. Allgemeiner Teil	3
2. Polysaccharidbasierte Nanopartikel	5
2.1. Herstellung von Nanopartikeln	7
2.2. Charakterisierung von Nanopartikeln	13
2.3. Biomedizinische Anwendbarkeit	17
3. <i>Lateral Flow Immunoassay</i>	21
3.1. Aufbau und Funktionsweise	21
3.2. Komponenten des Teststreifens	22
4. Synthese von Celluloseestern	25
4.1. Aktivierung der Carboxygruppe mit Carbodiimid	25
4.2. Aktivierung der Carboxygruppe mit Iminiumchlorid	27
4.3. Aktivierung der Carboxygruppe mit Tosylchlorid	28
II. Spezieller Teil	29
5. Kompositnanopartikel aus Celluloseestern und Farbstoffen	31
5.1. Herstellung und Charakterisierung	31
5.1.1. Dialyse	31
5.1.2. Eintropfverfahren	44
5.2. Kopplung von Kompositnanopartikeln mit Antikörpern	48
5.3. Anwendung von Kompositnanopartikeln im <i>Lateral Flow Immunoassay</i>	54

6. Reaktive Nanopartikel aus Aktivestern des Celluloseacetatphthalats	59
6.1. Aktivester des Celluloseacetatphthalats	60
6.1.1. Synthese und Charakterisierung	60
6.1.2. Umsetzung mit Aminen	68
6.2. Reaktive Nanopartikel	71
6.2.1. Herstellung und Charakterisierung	71
6.2.2. Funktionalisierung mit Fluoreszenzfarbstoff	75
6.2.3. Enzymfunktionalisierung reaktiver NHS-Nanopartikel	82
7. Reaktive Maleimidderivate des Celluloseacetats	85
7.1. Synthese und Charakterisierung	85
7.2. Umsetzung mit Thiolen	92
7.3. Bildung und <i>in situ</i> -Funktionalisierung von SH-reaktiven Nanopartikeln	97
8. Zusammenfassung	103
 III. Experimenteller Teil	 105
Materialien	107
Messmethoden	111
Nanopartikel	123
Herstellung der Nanopartikel	123
Behandlung der Nanopartikel	124
Immunassay	125
Herstellung der Nanopartikel-Antikörper-Konjugate	125
Herstellung der Teststreifen	126
Durchführung des <i>Lateral Flow Immunoassay</i>	127
Synthesen	129
NHS-Aktivester	129
Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat (NHS-CAP 1–9)	129
Celluloseacetat- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)phthalamat (CB-CAP)	131
Maleimidderivate	131
Cellulose-(6-maleimido)hexanoat (MAL-C 1–7)	131
Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA 1–4)	132
6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)-hexanoylcelluloseacetat (CUM-CA 1–4)	134

IV. Anhang	135
Literatur	137
Publikationsliste	147
Veröffentlichungen in <i>Peer Reviewed Journals</i>	147
Vorträge	147
Poster	147
Danksagung	149
Selbstständigkeitserklärung	151

Abbildungsverzeichnis

1.	Übersicht der Nanopartikel	6
2.	Ternäres Phasendiagramm für ein Gemisch aus Polymer, Lösungs- und Fällungsmittel	10
3.	Strukturformel der Cellulose	12
4.	Schematische Darstellung der potenziellen Energie in Abhängigkeit des Partikelabstands eines Kolloids in Bezug auf die DVLO-Theorie	15
5.	Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht eines Partikels	16
6.	Biomedizinische Anwendbarkeit von Polysaccharidnanopartikeln	18
7.	Schematischer Aufbau des <i>Lateral Flow Immunoassay</i>	22
8.	Reaktionsschema der Veresterung von Polysacchariden mit <i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid und 4-(1-Pyrrolidiny)pyridin	26
9.	Reaktionsschema der Veresterung von Polysacchariden mit Iminiumchlorid	27
10.	Reaktionsschema der Veresterung von Polysacchariden mit Tosylchlorid	28
11.	REM/Kryo-TEM-Aufnahmen der Nanopartikel ohne und mit eingelagertem Sudanschwarz B	33
12.	Schematische Darstellung der Einlagerung von hydrophoben Farbstoffen in Nanopartikeln aus Celluloseestern mittels Dialyse	35
13.	UV/Vis-Spektren von Sudanschwarz B in Mischungen von <i>N,N</i> -Dimethylacetamid und Wasser	41
14.	UV/Vis-Spektren von Sudanschwarz B, eingelagert in Folien und Nanopartikeln sowie als Feststoff	42
15.	Trübungskurven der Celluloseester und Farbstoffe	44
16.	Durchmesser und Polydispersitätsindex der Kompositnanopartikel, hergestellt mittels Eintropfverfahren nach verschiedenen Aufarbeitungsmethoden	47
17.	Schematische Darstellung der kovalenten Kopplung von anti-hCRP Antikörpern mit Kompositnanopartikeln	49
18.	REM-Aufnahmen der Kompositnanopartikel vor und nach der Antikörperkopplung	50

19.	Durchmesser und Polydispersitätsindex der Kompositnanopartikel im Verlauf der Kopplung mit Antikörpern gegen humanes C-reaktives Protein	52
20.	Ergebnisse des Bradford-Assay für die Kopplung von Antikörpern mit Kompositnanopartikeln, hergestellt mittels Eintropfverfahren	53
21.	<i>Lateral Flow Immunoassay</i> -Teststreifen für die Detektion von C-reaktivem Protein unter Nutzung von Kompositnanopartikeln, hergestellt mittels Dialyse	54
22.	<i>Lateral Flow Immunoassay</i> -Teststreifen für die Detektion von C-reaktivem Protein unter Nutzung von Kompositnanopartikeln, hergestellt mittels Eintropfverfahren	56
23.	Signalintensitäten der quantitativen optischen Auslesung der <i>Lateral Flow Immunoassay</i> Teststreifen unter Nutzung von Kompositnanopartikeln	57
24.	Synthesewege zur Gewinnung von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)-phthalat	61
25.	FT-IR-Spektren von Celluloseacetatphthalat und Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat	65
26.	¹³ C-NMR-Spektren von Celluloseacetatphthalat und Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat (NHS-CAP 7)	65
27.	¹ H-NMR-Spektrum von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat .	66
28.	¹³ C-NMR-Spektrum von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat (NHS-CAP-9)	67
29.	Reaktionsmechanismus der Bildung von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat mit Nebenstruktur	67
30.	Umsetzung zu Celluloseacetat- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)phthalamat	69
31.	FT-IR-Spektren von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat und Celluloseacetat- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)phthalamat	69
32.	¹³ C-NMR-Spektren von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat und Celluloseacetat- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)phthalamat	70
33.	FT-IR-Spektren von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat vor und nach der Partikelbildung sowie von dessen Partikel, funktionalisiert mit Ethanolamin	72
34.	REM-Aufnahmen der Nanopartikel vor und nach Behandlung mit Farbstoff DY-605	73
35.	¹³ C-NMR-Spektren von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat vor und nach der Partikelbildung	73
36.	Eigenschaften der Nanopartikel aus Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)-phthalat (NHS-CAP-NP 2) in Abhängigkeit des pH-Werts	74
37.	UV/Vis- und Fluoreszenzemissionsspektren des Farbstoffs DY-605 .	75
38.	Fluoreszenzemissionsspektren und relative Fluoreszenzflächen der Nanopartikel, funktionalisiert mit Farbstoff DY-605	78

39.	UV/Vis- und Fluoreszenzemissionsspektren sowie relativer Farbstoffgehalt der Nanopartikel, funktionalisiert mit Farbstoff DY-605 . . .	80
40.	Enzymaktivität und REM-Aufnahmen von Nanopartikeln, funktionalisiert mit Meerrettichperoxidase	83
41.	Synthesewege zur Gewinnung von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat	87
42.	FT-IR-Spektren von Celluloseacetat und Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat	90
43.	^{13}C -NMR-Spektren von Celluloseacetat und Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat	91
44.	Umsetzung von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat zu 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat	93
45.	FT-IR-Spektren von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat und 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat	94
46.	^{13}C -NMR-Spektren von 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetaten mit unterschiedlichem Substitutionsgrad	95
47.	Fluoreszenzemissionsspektren von 7-Mercapto-4-methylcumarin und 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat	96
48.	REM/Kryo-TEM-Aufnahmen von Nanopartikeln aus Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat	97
49.	^{13}C -NMR-Spektren von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat vor und nach der Partikelbildung	99
50.	REM-Aufnahmen von Nanopartikeln, funktionalisiert mit 7-Mercapto-4-methylcumarin	100
51.	UV/Vis- und Fluoreszenzemissionsspektren der wässrigen Suspensionen von Nanopartikeln, funktionalisiert mit 7-Mercapto-4-methylcumarin	101

Tabellenverzeichnis

1.	Cellulosebasierte Nanopartikel im <i>Drug Delivery</i>	19
2.	Nanopartikel aus Celluloseacetat und Celluloseacetatphthalat mittels Dialyse	32
3.	Kompositnanopartikel aus Celluloseacetat mit eingelagerten Farbstoffen mittels Dialyse	37
4.	Kompositnanopartikel aus Celluloseacetatphthalat mit eingelagerten Farbstoffen mittels Dialyse	38
5.	Kompositnanopartikel aus Celluloseacetatphthalat mit eingelagertem Sudanschwarz B mittels Eintropfmethode	46
6.	Kompositnanopartikel aus Celluloseacetatphthalat und Sudanschwarz B mittels Eintropfverfahren nach verschiedenen Aufarbeitungsmethoden	47
7.	Konjugate aus Antikörpern gegen humanes C-reaktives Protein und Kompositnanopartikeln	49
8.	Antikörperkopplung an Kompositnanopartikeln	51
9.	Kenngrößen des <i>Lateral Flow Immunoassay</i> für die Detektion von humanem C-reaktiven Protein unter Nutzung von Kompositnanopartikeln	57
10.	Bedingungen und Resultate der Synthese von Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat	62
11.	Nanopartikel aus Celluloseacetat, Celluloseacetatphthalat und Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat	72
12.	Nanopartikel aus Celluloseacetat, Celluloseacetatphthalat und Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat, funktionalisiert mit Farbstoff DY-605	77
13.	Relativer Farbstoffgehalt der mit Farbstoff DY-605 behandelten Nanopartikel	81
14.	Nanopartikel aus Celluloseacetat und Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat, funktionalisiert mit Meerrettichperoxidase	83
15.	Bedingungen und Resultate der Synthese von Cellulose-(6-maleimido)hexanoat und Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat	88
16.	Bedingungen und Ergebnisse der Umsetzung zu 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat	94
17.	Nanopartikel aus Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat	98

18.	Nanopartikel aus Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat, funktionalisiert mit 7-Mercapto-4-methylcumarin	99
19.	Werte für die Berechnung der durchschnittlichen Substitutionsgrade und molaren durchschnittlichen Substitutionsgrade	117
20.	Optimierte Parameter des <i>Lateral Flow Immunoassay</i> für verschiedene Nanopartikel-Antikörper-Konjugate (NP-AK-Konjugate)	127

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

4-PP	4-(1-Pyrrolidiny)pyridin
AA	2-Aminoanthrachinon
Ac	Acetatgruppe
AGE	Anhydroglucoseeinheit
AK	Antikörper
anti-hCRP	anti-humanes C-reaktives Protein
β	Massenkonzentration
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration
c^*	kritische Überlappungskonzentration
CA	Celluloseacetat
CAP	Celluloseacetatphthalat
CAPA	Celluloseacetatpropionatadipat
CAPr	Celluloseacetatpropionat
CAS	Celluloseacetatsebacat
CB	4-Chlorbenzylaminogruppe
CB-CAP	Celluloseacetat- <i>N</i> -(4-chlorbenzyl)phthalamat
CBC	Caseinpufferkonzentrat (<i>Casein Buffer Concentrate</i>)
CMCA	Carboxymethylcelluloseacetat
CMCAB	Carboxymethylcelluloseacetatbutyrat
CUM	(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thiogruppe
CUM-CA	6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2 <i>H</i> -chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat
δ	chemische Verschiebung
d	Durchmesser
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid
DLS	dynamische Lichtstreuung

DMA	<i>N,N</i> -Dimethylacetamid
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO- <i>d</i> ₆	deutერიertes Dimethylsulfoxid
DOP	6-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylgruppe
DP _v	viskositätsmittlerer Polymerisationsgrad (<i>Viscosity-Average Degree of Polymerization</i>)
DS	durchschnittlicher Substitutionsgrad
DSC	<i>N,N'</i> -Disuccinimidylcarbonat
DSO	<i>N,N'</i> -Disuccinimidylloxalat
DY	Farbstoff DY-605
ε	Extinktionskoeffizient
EA	Elementaranalyse
EC	Ethylcellulose
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
hCRP	humanes C-reaktives Protein
HEC	Hydroxyethylcellulose
HPC	Hydroxypropylcellulose
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPMCP	Hydroxypropylmethylcellulosephthalat
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
λ	Wellenlänge
LFA	<i>Lateral Flow Immunoassay</i>
<i>m</i>	Masse
<i>M</i> _n	zahlenmittlere molare Masse (<i>Number-Average Molar Mass</i>)
<i>M</i> _w	gewichtsmittlere molare Masse (<i>Weight-Average Molar Mass</i>)
MAL	(6-Maleimido)hexanoatgruppe

MAL-C	Cellulose-(6-maleimido)hexanoat
MAL-CA	Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat
MC	Methylcellulose
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MHS	6-Maleimidohexansäure
MMC	7-Mercapto-4-methylcumarin
MS	durchschnittlicher molarer Substitutionsgrad
n	Stoffmenge
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NHS-CAP	Celluloseacetat-(<i>N</i> -succinimidyl)phthalat
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NP	Nanopartikel
OC	Oxalylchlorid
φ	Volumenanteil
$\log P$	dekadischer Logarithmus des Verteilungskoeffizienten zwischen <i>n</i> -Octanol/Wasser
PB	Phosphatpuffer (<i>Phosphate Buffer</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PDI	Polydispersitätsindex
Ph	Phthalatgruppe
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenaktivität bzw. -konzentration
pI	isoelektrischer Punkt
pK_S	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
PS	Polysaccharid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFF	relative Fluoreszenzfläche
RFG	relativer Farbstoffgehalt
RFM	relative Farbstoffmenge
RHG	relativer Meerrettichperoxidase (HRP) Gehalt
RHM	relative Meerrettichperoxidase (HRP) Menge
SB	Sudanschwarz B

SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>Size Exclusion Chromatography</i>)
s-NHS	<i>N</i> -Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz
SR	Sudan IV
t	Zeit
T	Temperatur
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
TosCl	Tosylchlorid
UV/Vis	Ultraviolett/sichtbar (<i>Ultraviolet/Visible</i>)
V	Volumen
w	Massenanteil
ζ	Zetapotenzial

1. Einleitung und Zielstellung

Die Nanotechnologie hat sich als unentbehrliches Instrument im medizinischen Bereich für Diagnose und Therapie gleichermaßen herausgestellt. Durch ihr hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen können Nanopartikel (NP) eine Vielzahl von mehreren funktionalen Gruppen auf der Oberfläche tragen.^[1] Somit werden NP intensiv im Bereich der *in vivo*- und *ex vivo*-Detektion von Biomolekülen (z. B. Antigene) als Sensormaterialien untersucht. Sie erreichen durch eine gesteigerte multivalente Bindung (Avidität) hohe Ansprechraten und Sensitivitäten.^[1–3] NP sind außerdem als Wirkstoffträger im Bereich *Drug Delivery* von enormem Interesse, denn sie ermöglichen es, Wirkstoffe gezielt zum Wirkort im Organismus zu transportieren und kontrolliert freizusetzen.^[4,5] Gold- und farbstoffmarkierte Polystyrol-NP werden nach vorhergehender Modifizierung mit Detektionsantikörpern als Nanolabel in *Lateral Flow Immunoassays* (LFA) genutzt und bestimmen maßgeblich die Nachweisgrenzen, die mit diesen Tests erzielt werden können.^[6–9]

NP auf der Basis amphiphiler Polysaccharidderivate (PS-Derivate) besitzen ein besonderes Potenzial in der biomedizinischen Anwendung, da sie sich schnell und einfach herstellen lassen sowie biokompatibel sind.^[1,10–13] NP definierter Größe können unter milden Bedingungen durch Selbstanordnung amphiphiler PS-Derivate hergestellt werden.^[14] Die inhärente Tendenz von PS zur Ausbildung supramolekularer Strukturen unterstützt dabei den Herstellungsprozess.^[15,16] Durch chemische Modifizierung der PS-Derivate können weitere Funktionalitäten eingeführt werden.^[10,14,17,18]

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war es PS-NP zu entwickeln, die über zwei grundlegende Funktionalitäten verfügen: (I) reaktive Gruppen, die eine effiziente Kopplung insbesondere mit Antikörpern und Farbstoffmolekülen erlauben, und (II) eine Farbstoffmarkierung, die eine optische bzw. spektroskopische Detektion der Partikel ermöglicht. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden durch Anwendung homogener Synthesemethoden gezielt PS-Derivate synthetisiert und deren Selbstanordnung zu NP untersucht. Das Hauptaugenmerk lag auf der Anwendung der Partikel als LFA-Marker. Die Eigenschaften der neu entwickelten PS-NP (optische Eigenschaften, Immobilisierung von Antikörpern und/oder Farbstoffen, LFA-Performance) sollten dahingehend charakterisiert und optimiert werden. Gleichzeitig sollten die Partikel potenziell auch für *in vivo*-Anwendung (Sensorik, *Drug Delivery*) geeignet sein, weshalb ein weiterer Schwerpunkt auf der Herstellung und Folgefunktionalisierung reaktiver PS-NP lag.

Teil I.

Allgemeiner Teil

2. Polysaccharidbasierte Nanopartikel*

NP sind Materialien mit einer Größe im Bereich von 1 bis 1000 nm und weisen besondere Eigenschaften auf, die im makroskopischen Material gleicher chemischer Zusammensetzung nicht auftreten.^[19] Dies betrifft unter anderem thermodynamische (Phasenübergänge, Wärmekapazitäten), optische (Absorption durch Oberflächenplasmonen, Fluoreszenz), magnetische (Magnetisierung nicht magnetischer Metalle) und katalytische (Elektronenaffinität, Ionisierungspotenziale) Eigenschaften.^[20] Diese Eigenschaftsänderungen beruhen auf einer veränderten Dichte der elektronischen Zustände des Systems. Das wesentliche Merkmal von NP ist ihr hohes Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Folglich kann eine hohe Zahl verschiedener funktioneller Gruppen oder biologischer Moleküle auf der Oberfläche gebunden werden, die zur Reaktivität, Avidität und Multifunktionalität von NP beitragen.^[1]

Es gibt auch wesentlich enger gefasste Definitionen, die den Größenbereich für NP auf ≤ 100 nm oder sogar ≤ 10 nm begrenzen.^[1,21,22] Die engen Definitionen sind jedoch für viele polymerbasierte NP, zu denen auch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Materialien zählen, nicht anwendbar, da diese auch bei Größen ≥ 100 nm noch typische NP-Eigenschaften aufweisen.^[12,19,23–25]

NP lassen sich nach ihrer chemischen Zusammensetzung unterteilen (Abbildung 1). Diese Einteilung wird von Unterschieden in der Oberflächenstruktur der NP in Suspension gestützt. Anorganische Partikel umfassen Metall-, Metalloxid-, Silica- und Kohlenstoff-NP.^[26] Sie werden als „harte“ Partikel eingestuft sowie deren Oberfläche als ideal (glatt, chemisch homogen), starr (keine Deformation unter Scherung) und porenfrei betrachtet. Dementsprechend erfolgt eine scharfe Dichteänderung beim Übergang von der Partikeloberfläche zum umgebenden Medium.^[26–28] Die genannten Eigenschaften anorganischer Partikel vereinfachen die theoretische Darstellung ihres wirksamen elektrischen Potenzials, dem Zetapotenzial. Dem gegenüber stehen die organischen Partikel, welche sich in synthetische Polymere (Dendrimere, Latices, Mizellen) und Biopolymere (Proteine, Viren, DNA/RNA, PS) unterteilen lassen.^[26] Sie gelten als „weiche“ Partikel und ihre Oberfläche ist von „Polymerhaaren“ gekennzeichnet, deren Enden in das umgebende Medium ragen. Folglich ist der

*Dieses Kapitel basiert in Teilen auf der Publikation *Nanoparticles based on hydrophobic polysaccharide derivatives – Self-assembling principles, characterization techniques, and biomedical applications* von Martin Gericke, Peter Schulze und Thomas Heinze, eingereicht bei *Macromol. Biosci.*

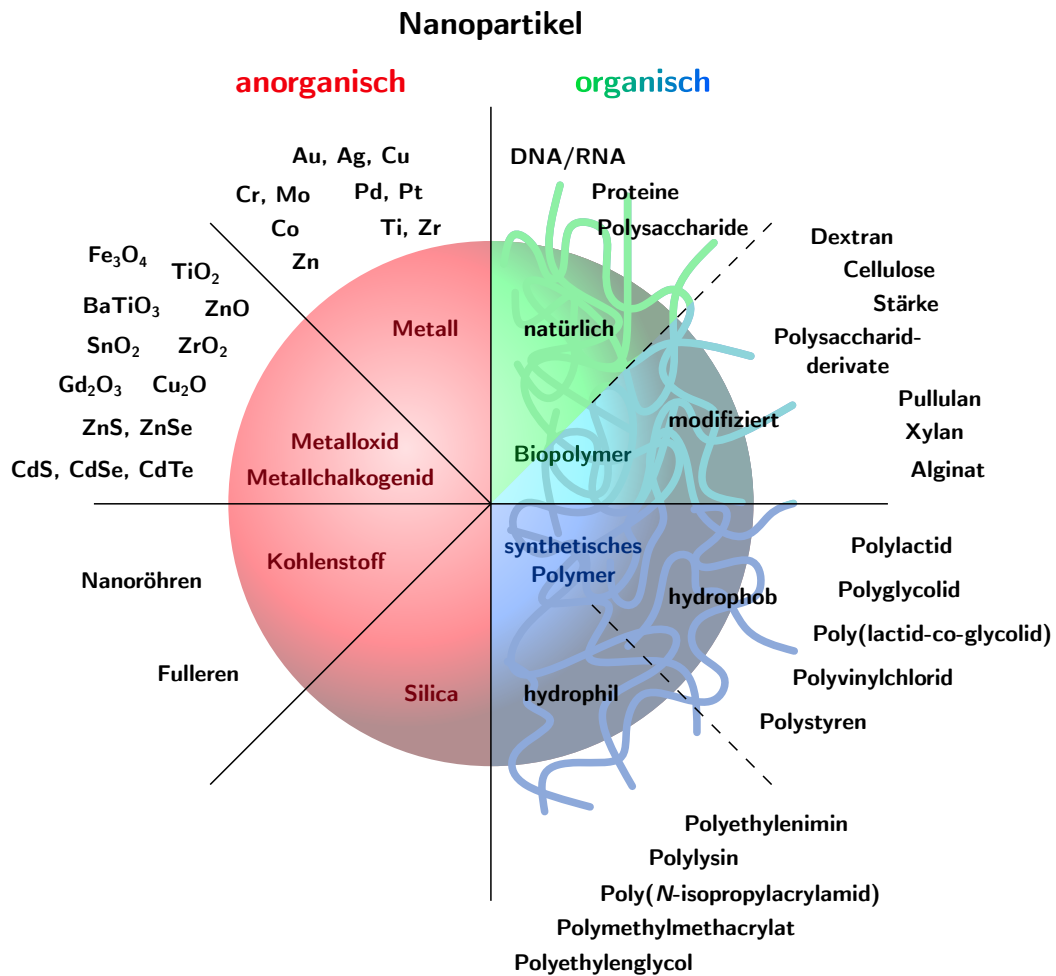


Abbildung 1. Übersicht der anorganischen und organischen Nanopartikel. Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[1,26]

Übergang vom Partikel zum umgebenden Medium von einer fließenden Änderung der Dichte geprägt.^[26–28] Die damit verbundene hydrodynamische Durchlässigkeit und Leitfähigkeit in einer permeablen Schicht in der Oberfläche bedingen eine komplexere Betrachtung des Zetapotenzials (siehe Abschnitt 2.2). Zusätzlich sind polymere NP fähig, durch Lösungsmittel zu quellen.^[29] Der Durchmesser (d) eines NP ist somit abhängig von dessen Art („hart/weich“) und der Bestimmungsmethode (in Suspension/als Feststoff, siehe Abschnitt 2.2).

Über die Einordnung polymerer NP als organische Materialien hinaus reicht ihre strukturelle Vielfalt von kompakten Nanosphären, ionisch oder kovalent vernetzten Partikeln, Polyelektrolytkomplexen über Nanogele, Nanokapseln, *Core-Shell*-Partikel bis zu Mizellen, Liposomen oder Polymersomen.^[12,19,30] Polymerbasierte NP umfassen dabei eine Vielzahl von möglichen Makromolekülen. Typische synthetische

Vertreter sind hydrophobe Polymere wie Polylactide, Polyglycolide, Poly(lactid-co-glycolid), Polyvinylchlorid oder Polystyrol sowie hydrophile Polymere wie Polyethylenimin, Polylysin, Poly(*N*-isopropylacrylamid), Polymethylmethacrylat oder Polyethylenglycol.^[1] Dementgegen beinhalten Biopolymere natürliche Strukturen wie DNA/RNA oder Proteine, die als NP in biologischen Systemen vorgefunden werden.^[26] Zu dieser Kategorie gehören auch native PS, die hydrophile Eigenschaften besitzen. PS treten zwar in der Natur auf, NP müssen jedoch künstlich aus ihnen gebildet werden. Ein Beispiel hierfür sind NP aus Cellulose mit kristalliner Struktur („Cellulosenanokristalle“).^[31] Die wichtige Klasse der modifizierten Biopolymere umfasst Derivate verschiedener PS wie Dextran, Cellulose, Stärke, Pullulan, Xylan, Chitosan oder Alginat.^[11,12,32] PS-Derivate formen unter anderem ionisch oder kovalent vernetzte NP sowie Polyelektrolytkomplexe als mögliche Strukturen. Eine weitere Art stellt die Umhüllung anderer NP mit einer Schale aus PS dar.^[33] Von großem Interesse sind hydrophobe PS-Derivate, die durch Selbstanordnung NP bilden können und zu denen die Materialien in dieser Arbeit zählen. Sie entsprechen in ihrer Struktur kompakten Nanosphären, deren fester Matrixkern phasensepariert vorliegt.^[19,25,30] NP aus hydrophoben PS-Derivaten besitzen entscheidende Vorteile. Die gleichmäßige sphärische Gestalt der Partikel, verbunden mit der chemischen Modifizierbarkeit der Derivate vor der Partikelbildung, gewährt Zugriff auf NP mit definierten Oberflächeneigenschaften. Im Folgenden wird diese Art von Partikeln basierend auf hydrophoben Derivaten durch PS-NP beschrieben.

2.1. Herstellung von Nanopartikeln

Die Herstellung von NP kann in zwei Arten von Verfahren eingeteilt werden: *top-down*- und *bottom-up*-Prozesse. Im *top-down*-Prozess wird der größere Materialverbund in Teile desintegriert, wobei neben kleineren Aggregaten auch NP entstehen.^[23,34–36] Diese Art der Herstellung bringt NP hervor, die in Form und Größe undefiniert sind sowie eine entsprechende Polydispersität aufweisen.^[37] Im Falle von hydrophilen PS wie Cellulose ist die säurehydrolytische Gewinnung von Cellulosenanokristallen ein Beispiel für einen *top-down*-Prozess.^[31] Dabei werden vorwiegend die amorphen Bereiche der Cellulosefasern durch Säure hydrolysiert. Die kristallinen Bereiche bleiben währenddessen intakt, da sie einen höheren Widerstand gegen den Angriff der Säure aufweisen. Infolgedessen besitzen die Cellulosenanokristalle eine ähnliche Morphologie und Kristallinität wie die ursprünglichen Cellulosefasern. Jedoch sind *top-down*-Prozesse für hydrophobe PS-Derivate nicht anwendbar.

Im Gegensatz dazu liefern *bottom-up*-Prozesse NP, deren Struktur, Form, Größe und chemische Zusammensetzung besser kontrollierbar sind.^[37] Atome oder Moleküle ordnen sich zu größeren Nanostrukturen an. Wachstum und Selbstanordnung können im Verlauf gezielt beeinflusst werden, um die Eigenschaften der Partikel zu bestimmen. Polymerbasierte NP werden vor allem aus der flüssigen Phase gewon-

nen, auch wenn die Herstellung aus der Gasphase in einigen Fällen möglich ist.^[38] Ausgehend vom vorgeformten Makromolekül bilden sich NP durch spontane oder induzierte Selbstanordnung.^[11,12,25]

Die Herstellung von NP aus Polymerlösungen kann auf verschiedene Weise erfolgen. Alternative Verfahren wie das Aussalzen oder die Expansion überkritischer Lösungen werden vorwiegend für synthetische Polymere genutzt.^[25] Mit Hinblick auf Biopolymere können je nach Art des PS kovalente oder ionische Vernetzung sowie Polyelektrolytkomplexe angewendet werden. Für die Bildung von NP mittels kovalenter Vernetzung werden oft Dialdehyde wie Glutaraldehyd für Hydroxygruppen von PS oder Di- und Tricarbonsäuren für Chitosan eingesetzt.^[11,12] Die ionische Vernetzung wird für geladene PS mit entgegengesetzt geladenen ionischen Gruppen oder mithilfe von Salzen durchgeführt.^[11,12] Beispielsweise wird Chitosan mit Triphosphat und Alginat mit Calciumionen vernetzt. Polyelektrolytkomplexe werden durch entgegengesetzt geladene Polyelektrolyte gebildet, wie durch das positiv geladene Chitosan mit negativ geladenem Alginat, Dextransulfat, Carboxymethylcellulose oder auch Peptiden und Nukleinsäuren.^[11,12]

Im Folgenden soll die Bildung von PS-NP durch Selbstanordnung hydrophober PS-Derivate im Fokus stehen, da diese für die Materialien in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Die Selbstanordnung kann durch zwei Verfahren realisiert werden: Emulsion-Evaporation und Lösungsmittelverdrängung.

In dem Verfahren der Emulsion-Evaporation wird das hydrophobe PS-Derivat in einem leichtflüchtigen, nicht wassermischbaren Lösungsmittel, wie Dichlormethan oder Ethylacetat, gelöst.^[25,39] Anschließend wird die organische Lösung mit der wässrigen Lösung eines stabilisierenden Schutzkolloids, wie Polyvinylalkohol, versetzt. Aus beiden Phasen wird mittels Ultraschall eine Nanoemulsion gebildet, in der fein verteilte Lösungsmitteltröpfchen im Wasser vorliegen. Das Lösungsmittel aus den Nanotröpfchen wird verdampft und das darin gelöste Polymer bildet eine stabile wässrige Suspension von NP. Die erhaltenen Partikel können durch Ultrazentrifugation mit reinem Wasser gewaschen werden, um das Schutzkolloid zu entfernen.

Emulsion-Evaporation ist vergleichsweise energieintensiv, da eine thermische und Ultraschallbehandlung der Proben nötig ist.^[25,39] Empfindliche Polymere können dadurch möglicherweise abgebaut werden. Mit Rücksicht auf eine spätere medizinische Anwendung der Partikel sind häufig genutzte chlorierte Lösungsmittel (wie Dichlormethan) von Nachteil. In der Regel ist das Waschen der Partikel notwendig, um das Schutzkolloid zu entfernen, und nur in wenigen Fällen kann eine stabile Nanoemulsion ohne Schutzkolloid gebildet werden. Im Gegenzug erlaubt es die Herstellung größerer Mengen NP, da man hohe Polymerkonzentrationen anwenden kann. Es sind Partikel erzielbar, die eher kleine Durchmesser mit schmaler Verteilung zeigen. Aus physikochemischer Sicht stellt die Emulsion-Evaporation ein hochenergetisches Verfahren dar, bei dem die Partikeleigenschaften (Größe und Verteilung) hauptsächlich durch einstellbare externe Parameter wie Energiemenge, Beschallungszeit

oder Menge und Art des Schutzkolloids bestimmt werden.^[24,39] Da insbesondere das Schutzkolloid störend auf die nachträgliche Funktionalisierung an der Partikeloberfläche wirken kann, wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Emulsion-Evaporation verzichtet.

Die Verdrängung des Lösungsmittels oder auch Nanofällung (*solvent displacement/solvent shifting/nanoprecipitation*) stellt ein weiteres Verfahren zur Herstellung polymerer NP dar. Das Polymer wird in einem wassermischbaren Lösungsmittel gelöst und dessen Löslichkeit wird sukzessiv durch Hinzufügen des Fällungsmittels Wasser verringert, bis es als NP ausfällt.^[39,40] Dieser Vorgang lässt sich durch die Methode der Dialyse oder des Eintropfens realisieren. In der Dialyse wird eine Membran genutzt, um Polymerlösung und Wasser voneinander zu trennen sowie eine langsame Mischung beider Phasen durch Osmose zu gewährleisten.^[41] Das Lösungsmittel wird schrittweise durch einige Wechsel des umgebenden Dialysats entfernt und die wässrige Suspension der Partikel wird erhalten. Dialyse liefert lösungsmittelfreie Partikel in einem Schritt und stellt eine schonende Partikelherstellung dar. Bei der Eintropfmethode wird die verdünnte Polymerlösung vorgelegt und gerührt, während tropfenweise Wasser hinzugegeben wird.^[42,43] Es kann auch in umgekehrter Weise die Polymerlösung in Wasser getropft werden. Die Partikel fallen aus und das Lösungsmittel kann durch Erhitzen entfernt werden, um die wässrige Suspension zu erhalten. Partikel lassen sich zwar schnell mit dem Eintropfen generieren, jedoch ist ähnlich zur Emulsion-Evaporation die thermische Behandlung der Probe nötig, um das Lösungsmittel zu entfernen. Neuere Weiterentwicklungen der Lösungsmittelverdrängung wie die *flash nanoprecipitation* ermöglichen die robuste Herstellung von NP mit präzisen Eigenschaften im Produktionsmaßstab.^[44]

Physikochemisch stellt die Lösungsmittelverdrängung ein niederenergetisches Verfahren dar, welches durch intrinsische physikochemische Parameter wie Solvatisierungsfähigkeit des Lösungsmittels, Polymerkonzentration sowie die Balance von Hydrophobie und Hydrophilie entlang des Polymerrückgrats gesteuert wird.^[24,39] Im Falle des Eintropfverfahrens lassen sich die Partikel trotzdem zusätzlich durch Variation der Injektionsrate der zugegebenen Phase, der Rührgeschwindigkeit in der vorgelegten Phase, des Verhältnisses beider Phasen und der Zugaberichtung (organisch zu wässrig oder umgekehrt) beeinflussen.^[25] Allgemein hängt die Lösungsmittelverdrängung stärker als die Emulsion-Evaporation von der anfänglichen Polymerkonzentration ab, da sie kleiner sein muss als die kritische Überlappungskonzentration (c^*).^[39]

Zwei Bedingungen für die Herstellung von NP mittels Lösungsmittelverdrängung müssen grundsätzlich erfüllt sein. Zum einen muss das betreffende Makromolekül als molekulardisperses System in einem Lösungsmittel vorliegen.^[39,43] Demzufolge neigen die solvatisierten Polymerketten bei Verringerung ihrer Löslichkeit im Medium dazu, sphärische Nuklei zu bilden. Wie bereits erwähnt, liegt eine für die Herstellung ausreichend verdünnte Lösung vor, wenn die Polymerkonzentration unterhalb von c^* liegt. Oberhalb von c^* sind die Polymerketten in der Lösung ineinander verschlauft,

wodurch eine unregelmäßige Aggregation während der Fällung hervorgerufen wird. Zum anderen muss der Fällungsprozess langsam genug sein, damit die freie Energie des Systems minimiert und die Gleichgewichtsmorphologie erreicht wird.^[39,41] Dies betrifft hauptsächlich den entscheidenden thermodynamischen Parameter der freien Grenzflächenenergie, der die sphärische Partikelform bedingt. Nachfolgend werden die Prozesse beschrieben, die den Ablauf der Partikelbildung modellieren.

Der Schritt der Partikelbildung selbst wird durch Fluktuationen der Polymerkonzentration in der Grenzschicht erklärt, die sich beim Mischen zwischen Lösungs- und Fällungsmittel bildet.^[35,39,46] Diese Grenzschicht ist zu Beginn der Ort der höchsten Übersättigung, die die Abscheidung des Polymers an der Grenzfläche hervorruft. Im ternären Phasendiagramm von Polymer, Lösungsmittel und Fällungsmittel wird der einphasige Bereich (homogen) bei hohen Anteilen des Lösungsmittels vom zweiphasigen Bereich (heterogen) bei niedrigen Anteilen des Lösungsmittels durch die Binodale als Grenze getrennt (Abbildung 2).^[35,42] Im Bereich der Binodalen existiert die Spinodale als zweite Grenze, innerhalb derer sich das System spontan entmischt, d. h., es bilden sich makroskopische Aggregate. Zwischen Binodale und Spinodale befindet sich der metastabile Bereich, in dem das Polymer aus der übersättigten Lösung durch Fluktuationen der Konzentration Nuklei bildet, die weiter zu NP wachsen. Innerhalb des metastabilen Bereichs tritt bei geringen Polymerkonzentrationen der sogenannte „Ouzo-Bereich“ auf, in dem ausschließlich NP gebildet werden. Im restlichen metastabilen Bereich werden sowohl Nano- als auch Mikropartikel gebildet, da hier die Polymerkonzentration hoch genug ist, damit gebildete Partikel groß genug werden, um zu größeren Mikropartikeln zu koagulieren.^[42,45] Im Wesentlichen

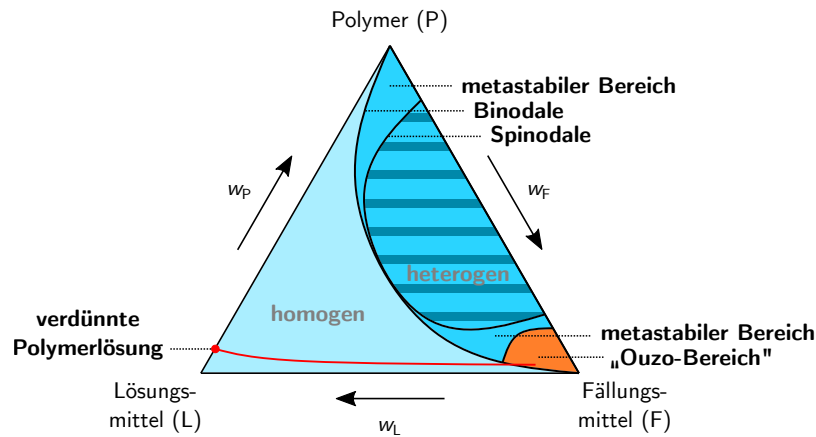


Abbildung 2. Ternäres Phasendiagramm für ein Gemisch aus Polymer, Lösungs- und Fällungsmittel. Der rote Punkt beschreibt schematisch eine verdünnte Polymerlösung als Start für die Zugabe von Fällungsmittel. Durch die Zugabe verändert sich die Zusammensetzung des Systems entlang der roten Linie bis in den „Ouzo-Bereich“. Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[35,45]

wird durch Zugabe des Fällungsmittels zum einphasigen System aus Polymer und Lösungsmittel die Binodale im Phasendiagramm auf der Seite sehr niedriger Polymerkonzentration durchschritten (rote Linie in Abbildung 2). Infolgedessen befindet sich das System im „Ouzo-Bereich“ und es bilden sich NP.

Zwei Mechanismen beeinflussen den Durchmesser und die Größenverteilung, angegeben durch den Polydispersitätsindex (PDI), der resultierenden NP in Suspension.^[42] Zuerst nukleieren die Makromoleküle aufgrund der Fluktuationen der Konzentration, verursacht durch Mischen von Lösungs- und Fällungsmittel. Danach wachsen Nuklei weiter, indem sie andere Makromoleküle adsorbieren, während die Löslichkeit weiter verringert wird (Mechanismus der Nukleation und Wachstum). Da aber auch die Anzahl der Nuklei zunimmt, können diese durch Kollision miteinander aggregieren (Mechanismus der Nukleation und Aggregation). Beide Mechanismen erklären die Zunahme des durchschnittlichen Partikeldurchmessers und der Größenverteilung mit steigender Polymerkonzentration in der Methode der Lösungsmittelverdrängung.^[39] Diese drei Stadien der Nukleation, Wachstum und Aggregation mit ihren jeweiligen Raten bestimmen die Eigenschaften des NP. Für eine einheitliche Partikelbildung sollte die Nukleationsrate hoch und die Wachstumsrate niedrig sein.^[25]

Der Einfluss struktureller Eigenschaften hydrophober PS-Derivate auf die NP-Bildung wurde bereits eingehend untersucht, wie z. B. der Einfluss der Hydroxygruppen von Celluloseacetaten (CA).^[43] Die Wiederholungseinheit der Cellulose, die Anhydroglucoseeinheit (AGE), weist drei Hydroxygruppen an den Positionen 2, 3 sowie 6 auf (Abbildung 3). Der Anteil der funktionalisierten Hydroxygruppen wird als durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS) angegeben und nimmt somit Werte zwischen null und drei an ($0 \leq DS \leq 3$). Es ist notwendig, Cellulose mit hydrophoben Gruppen zu funktionalisieren, damit NP gebildet werden können. Jedoch konnte beobachtet werden, dass vollsubstituierte CA ($DS = 3$) ausschließlich Aggregate und keine NP formen.^[43] Dies wird mit der Abstoßung der Acetatgruppen erklärt, die zur Streckung der Cellulosekette und der Bildung steifer Stäbchen führen kann. Somit ist die Selbstanordnung zu sphärischen Partikeln nicht mehr möglich. Bereits ein geringer Rest an Hydroxygruppen ($DS = 2,94$) ermöglicht die Selbstanordnung zu Partikeln. Weiterhin übt das Substitutionsmuster der CA einen Einfluss auf deren Partikelbildung aus.^[43] CA mit einem $DS = 2$ wurden zum einen mittels Hydrolyse des Cellulosetriacetats und zum anderen durch direkte Veresterung der Cellulose hergestellt. Das Produkt der Hydrolyse weist eine gleichmäßige Verteilung der Acetate auf und bildet NP. Das Produkt der Veresterung hingegen formt Aggregate. Dies wird auf die bevorzugte Funktionalisierung der C2- und C6-Position zurückgeführt.^[43,47] Der hohe Gehalt an Hydroxygruppen in C3-Position führt zur Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken von O(3')-H zu O(5) (Abbildung 3). Dadurch sind die CA-Moleküle für die Selbstanordnung zu sphärischen NP nicht flexibel genug und aggregieren stattdessen.

Aus den vorhergehenden Betrachtungen lassen sich entscheidende Voraussetzun-

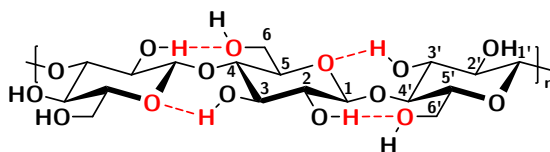


Abbildung 3. Strukturformel der Cellulose mit der Anhydroglucoseeinheit (AGE) als Wiederholungseinheit und der schematischen Darstellung der intramolekularen Wasserstoffbrücken entlang der Cellulosekette. Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[16,31]

gen für Strukturen von hydrophoben PS-Derivaten ableiten, die auch Anforderungen an deren Synthese stellen. Ein wesentliches Merkmal der Selbstanordnung als *bottom-up*-Prozess ist, dass vor allem dichte Partikel mit amorpher Struktur generiert werden.^[25,26] Dabei ordnen sich die hydrophoben Segmenten des Polymers zu einem Kern an und die hydrophilen Segmente bilden mit Wasser eine Hülle.^[14] Dementsprechend verbessern große hydrophobe Gruppen am Rückgrat des PS die Stabilität der gebildeten NP. Die Balance von Hydrophilie und Hydrophobie übt jedoch einen Einfluss aus und kann generell durch den DS eingestellt werden. Je höher der DS der hydrophoben Gruppe, desto höher ist die Hydrophobie und das Polymer ordnet sich leichter an. Somit bildet es kompakte innere Kerne und kleinere NP. Trotzdem führt eine zu hohe Hydrophobie durch zu starke Modifizierung zur Aggregation des Polymers.^[14] Außerhalb dieses optimalen Bereichs der Balance ist somit keine Partikelbildung möglich.^[48] Der Durchmesser der NP kann auch durch Größe der hydrophoben Gruppe und Molmasse des Polymers kontrolliert werden. Die Oberflächenladung der NP kann durch DS, Größe und Art der hydrophoben Gruppe verändert werden.^[11]

Die Wechselwirkung des NP-Kerns, der aus hydrophoben Gruppen besteht, mit eingelagerten Substanzen, die schlecht wasserlöslich sind, beeinflusst die Effizienz der Beladung.^[14] Der Ausschluss von Wasser ist die vorwiegende Triebkraft für die Einlagerung. Es lassen sich aber hohe Beladungen erzielen, indem zusätzlich π - π -Wechselwirkungen genutzt werden.^[14] Diese treten zwischen aromatischen Strukturen, die als hydrophobe Gruppen an das PS gebunden sind, und Aromaten der eingelagerten Substanz auf. In diesem Zusammenhang besitzt Celluloseacetatphthalat (CAP) großes Potenzial, wurde aber bisher nur wenig als NP-bildendes Material untersucht.^[43,49] CAP bietet einerseits hydrophobe Acetat- und Phthalatgruppen, die für die Selbstanordnung zu sphärischen NP nötig sind, und andererseits funktionelle Carboxygruppen für weitere chemische Modifizierungen. Zudem ist CAP als Material im pharmazeutischen Bereich zugelassen.^[50]

Für die Bildung von PS-NP spielen somit Art und DS der hydrophoben Gruppen sowie deren Verteilung entlang des Rückgrats und Balance mit verbleibenden Hydroxygruppen eine Rolle. Diese Parameter werden für die Synthese und Auswahl der PS-Derivate in der vorliegenden Arbeit einbezogen.

2.2. Charakterisierung von Nanopartikeln

Die wichtigen Charakteristika von NP sind deren Durchmesser (d), der Polydispersitätsindex (PDI) als Maß für die Größenverteilung und das Zetapotenzial (ζ). Ihre Bestimmung ist entscheidend für die Entwicklung von NP oder auch deren Funktionalisierung, da sie diese maßgeblich beeinflussen.^[51] Für die Messung des Partikeldurchmessers haben sich zwei Methoden bewährt: dynamische Lichtstreuung (DLS) und Raster- bzw. Transmissionselektronenmikroskopie (REM bzw. TEM).

Das Messprinzip der DLS beruht auf der Streuung von Laserlicht, das auf die NP der suspendierten Probe in einer Messküvette trifft. Das gestreute Licht der Probe breitet sich in alle Richtungen aus und wird in einem bestimmten Winkel detektiert, üblich sind beispielsweise 13° (Vorwärtsstreuung), 90° oder 173° (Rückstreuung).^[52,53] Sofern der Partikeldurchmesser kleiner als die Wellenlänge des eingestrahlten Laserlichts ist (d.h. $d < \lambda/10$), wird das Streulicht mit der Rayleigh-Streuung beschrieben. Ist die Größe der Partikel ähnlich oder größer als die Wellenlänge, verhält sich das Streulicht entsprechend der Mie-Streuung.^[54] Das detektierte gestreute Licht weist zeitabhängige Fluktuationen in seiner Intensität auf, die durch die Brownsche Bewegung der NP in Suspension während der Messung hervorgerufen werden. Diese Fluktuationen werden mit einer Korrelationsfunktion $G(\tau)$ in Form eines Integrals der Produkte von Intensitäten I zu einer Zeit t und einer verzögerten Zeit ($t + \tau$) ausgedrückt:^[52]

$$G(\tau) = \langle I(t)I(t + \tau) \rangle \quad (1)$$

bzw. in der normalisierten Form:

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t + \tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}. \quad (2)$$

Die normalisierte Korrelationsfunktion $g(\tau)$ wird mit der des elektrischen Felds über die Siegert-Relation verknüpft. Unter Annahme von monodispersen NP klingt der Korrelationsfaktor des elektrischen Felds exponentiell ab und nach Ersetzung der zugehörigen Abklingkonstante ergibt sich:^[52]

$$g(\tau) = 1 + \beta e^{-2Dq^2\tau}, \quad (3)$$

wobei β der Kohärenzfaktor, D der Diffusionskoeffizient und q der Streuvektor ist. Damit ist die gemessene Intensitätsfluktuation mit der Diffusion der NP verknüpft.^[52] Schließlich kann über die Stokes-Einstein-Gleichung der hydrodynamische Partikelradius R aus dem Diffusionskoeffizienten D ermittelt werden:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (4)$$

wobei k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur und η die dynamische Viskosität des Mediums ist. Für die rechnerische Ermittlung des Partikeldurchmessers

und des PDI aus den Messdaten wird eine Kumulantenanalyse zur Näherung der Korrelationsfunktion durchgeführt.^[52,55] Bei der Einschätzung der Ergebnisse der DLS ist zu beachten, dass lediglich die Größe einer angenommenen äquivalenten Sphäre ermittelt wird, die auf die gleiche Weise wie die untersuchten Partikel diffundiert. Sie liefert somit keine Informationen über deren Gestalt. In der DLS wird also der hydrodynamische Durchmesser gemessen, der für den Partikel mit seiner Hülle aus Lösungsmittelmolekülen gilt. Weiterhin können eng beieinander liegende Verteilungen von Partikeln nicht getrennt werden und die Probe darf nicht bei der Wellenlänge des verwendeten Lasers absorbieren.^[51] Während die DLS zur Messung von NP in wässriger Suspension verwendet wird, lassen sich Größe und Gestalt von getrockneten NP mittels elektronenmikroskopischer Experimente untersuchen.

In der Elektronenmikroskopie wird eine Probe üblicherweise unter Hochvakuum mit einem Elektronenstrahl abgerastert und die auftretenden Wechselwirkungen des Objekts mit den Elektronen werden zur Bilderzeugung genutzt. Eine häufig verwendete Methode ist die Detektion von Sekundärelektronen (REM), mit der auch in dieser Arbeit Bilder von NP aufgenommen wurden. Es ist ebenfalls möglich, die transmittierten Elektronen nach dem Durchgang hinter der Probe zu detektieren (TEM).^[56] REM bietet den Vorteil, neben Partikelgröße und Größenverteilung auch die Form der NP wiederzugeben. Da die Partikel vor der Messung auf dem Trägermaterial (z. B. Glimmer) getrocknet werden müssen, erlaubt REM jedoch keinen Rückschluss auf den vorherigen Zustand des Partikels in der Suspension. Zudem wechselwirken organische Proben nur wenig mit dem Elektronenstrahl, da sie zum großen Teil aus leichten Atomen mit niedriger Elektronendichte bestehen, und müssen deshalb mit einer dünnen Metallschicht überzogen werden.^[51] Dafür werden die Proben vor der Messung mit Metallen (z. B. Platin) bedampft („Sputtern“). Die Kryo-TEM ermöglicht die Messung von NP nah an ihrem ursprünglichen Zustand. Die Probe wird mit flüssigen Gasen (z. B. Stickstoff, Ethan) schockgefrostet und die flüssige Phase erstarrt amorph. So lassen sich strukturelle Beeinträchtigungen der NP durch Trocknen oder Bedampfen vermeiden. Außerdem gewährt TEM Einsicht in die innere Struktur (z. B. *Core-Shell*) von Partikeln.^[57] Die elektronenmikroskopischen Methoden sind mit einem höheren experimentellen Aufwand verbunden und daher nicht als Routinemessmethoden geeignet. In einem Vergleich desselben Partikels ist festzustellen, dass mit DLS (gequollene, solvatisierte Partikel) tendenziell ein größerer Durchmesser als mit REM (getrocknete Partikel) gemessen wird.

Das Zetapotenzial, auch elektrokinetisches Potenzial, ist ein Maß für die Stabilität von Kolloiden gegenüber Aggregation und Sedimentation.^[54] Ein Kolloid bezeichnet ein heterogenes System, in der eine Phase fein verteilt (Nanometerbereich) in einer kontinuierlichen Phase vorliegt. Es befindet sich damit zwischen echten Lösungen (molekular dispers) und groben Dispersionen.^[58] Kolloide lassen sich mithilfe der DVLO-Theorie (benannt nach Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) beschreiben (Abbildung 4).^[59] Einerseits stoßen sich Partikel gegenseitig elektrostatisch ab, andererseits ziehen sie sich aufgrund von Van-der-Waals-Kräften an. Demnach sorgt

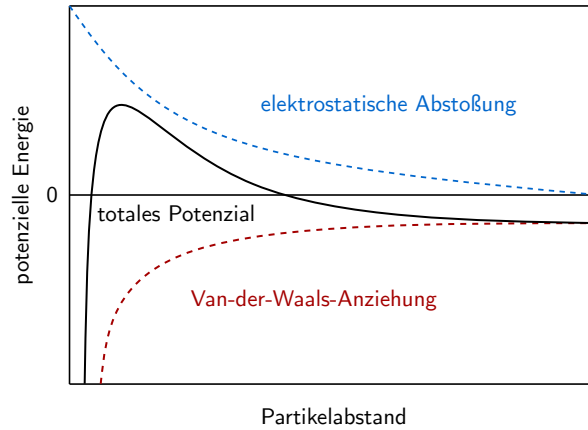


Abbildung 4. Schematische Darstellung der potenziellen Energie in Abhängigkeit des Partikelabstands eines Kolloids in Bezug auf die DVLO-Theorie. Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[59]

die energetische Barriere bei kürzeren Partikelabständen für ein stabiles Kolloid. Stöße zwischen Partikeln, die ausreichend Energie aufbringen, führen zur Aggregation. Neben der elektrostatischen gibt es noch die sterische Stabilisierung, wenn Makromoleküle an der Partikeloberfläche vorhanden sind.^[29]

Die elektrostatische Abstoßung hängt vom Oberflächenpotenzial der Partikel ab. Liegt ein Partikel in einer flüssigen Phase vor, bildet er aufgrund seiner geladenen Oberfläche eine elektrochemische Doppelschicht mit Ionen aus dem umgebenden Medium aus (Abbildung 5).^[60] Die Doppelschicht besteht aus einem inneren Bereich – der Stern-Schicht, in der Ionen relativ fest an die Oberfläche des Partikels gebunden sind. Im äußeren Bereich – der diffusen Schicht – werden die Ionen schwächer angezogen und sind locker gebunden. Der Partikel ruht aber nicht im Medium, sondern bewegt sich ständig aufgrund der Brownschen Bewegung. Bei der Messung des Zetapotenzials bewegt sich der Partikel gerichtet im angelegten elektrischen Feld. Während der Bewegung wandert ein Teil der Doppelschicht mit dem Partikel, wohingegen der Rest der diffusen Schicht abgeschert wird. An dieser hydrodynamischen Scherebene herrscht das Zetapotenzial.

Die Messung des Zetapotenzials erfolgt, indem die Geschwindigkeit des Partikels im angelegten elektrischen Feld mittels Laser-Doppler-Anemometrie gemessen wird.^[54,61] Das Licht im Messvolumen wird von den sich bewegenden Partikeln gestreut, wobei die Frequenzänderung des Streulichts von der Geschwindigkeit der Partikel bestimmt wird. Die Frequenzänderung wird durch Überlagerung mit dem Referenzstrahl gemessen. Die Geschwindigkeit des Partikels v hängt von seiner elektrophoretischen Mobilität u im elektrischen Feld E ab:^[62]

$$v = uE. \quad (5)$$

Unter gewissen Modellannahmen (u. a. vernachlässigte Oberflächenleitung und Pola-

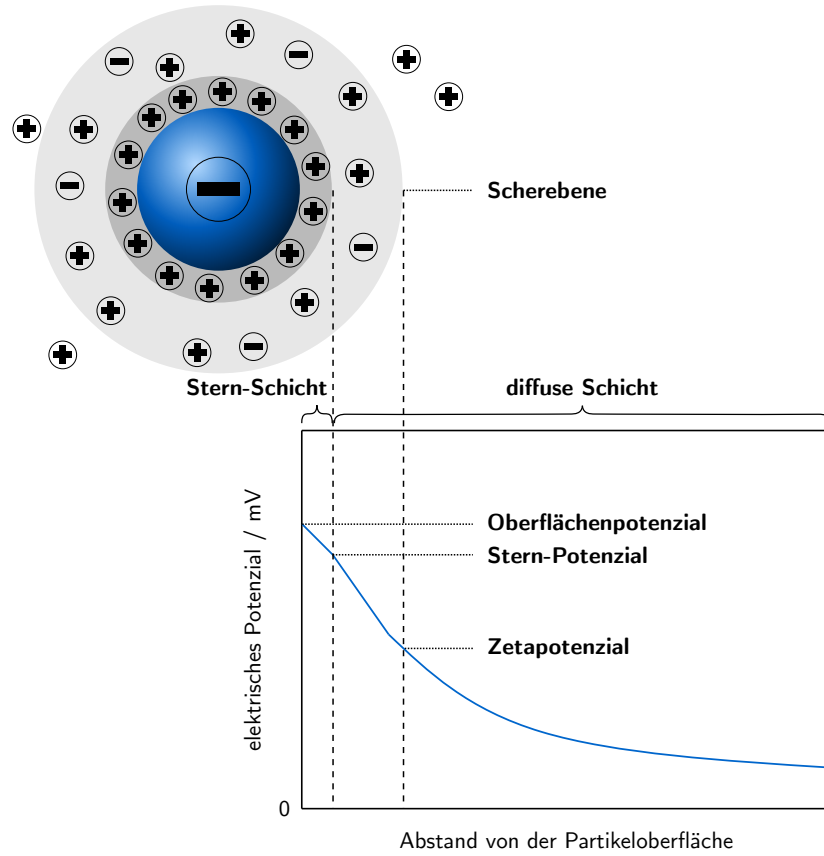


Abbildung 5. Schematische Darstellung der elektrochemischen Doppelschicht eines Partikels. Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[60]

risation der Doppelschicht) wird die Abhängigkeit der elektrophoretischen Mobilität u des Partikels vom Zetapotenzial ζ durch die Henry-Gleichung beschrieben:^[62]

$$u = \frac{2}{3} \frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{\eta} f(\kappa a), \quad (6)$$

wobei $\varepsilon_0 \varepsilon$ die Permittivität und η die dynamische Viskosität des Mediums sowie $f(\kappa a)$ die Henry-Funktion ist. Die Debye-Länge κ ist eine inverse Länge und κ^{-1} kann als Dicke der Ionenhülle angesehen werden. Mit der Helmholtz-Smoluchowski-Näherung gilt für Partikel mit großem Radius a und schmaler Ionenhülle, dass $\kappa a \gg 1$ ist. Für Messungen polymerer NP im wässrigen Medium ist die Helmholtz-Smoluchowski-Näherung hinreichend erfüllt. Daraus folgt für die Henry-Funktion $f(\kappa a) = 1,5$ und man erhält für die elektrophoretische Mobilität:^[62]

$$u = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon \zeta}{\eta}. \quad (7)$$

Weisen Partikel einen Zetapotenzialbetrag über 30 mV auf (d. h. $\zeta < -30$ mV bzw. $\zeta > 30$ mV), liegt in der Regel ein stabiles Kolloid vor, da sich die Partikel

ausreichend gegenseitig abstoßen.^[54] Für die Oberflächenladung von Partikeln in einer Suspension werden verschiedene Ursachen diskutiert. Die Ladung wird hauptsächlich auf die bevorzugte Adsorption von bestimmten Ionen an der Oberfläche zurückgeführt.^[63] Sind sonstige Elektrolyte im wässrigen Medium nicht vorhanden, können dies auch Hydroxidionen sein. Dadurch lässt sich eine negative Ladung von Partikeln aus nicht ionogenen Polymeren erklären. Die Dissoziation von ionogenen Oberflächengruppen oder von adsorbierten Molekülen verursacht ebenfalls geladene Partikel.^[64]

Das Zetapotenzial wird durch Faktoren wie den pH-Wert und die Ionenstärke des umgebenden Mediums sowie von der Partikelgröße und -konzentration beeinflusst.^[54,59] Unter sauren Bedingungen wird das Zetapotenzial positiv, wohingegen es im basischen Milieu negative Werte annimmt. So lässt sich durch Titration der isoelektrische Punkt als den pH-Wert bestimmen, an dem das Zetapotenzial den Wert null annimmt. Gelangt der pH-Wert in die Nähe des isoelektrischen Punkts, aggregieren die Partikel des instabilen Kolloids. Die Erhöhung der Elektrolytkonzentration im Medium führt im Allgemeinen zur Abschirmung von elektrischen Ladungen. Es kommt zur Kompression der Doppelschicht um den Partikel und so zur Absenkung des Zetapotenzials, bis die elektrostatische Abstoßung nicht mehr ausreicht und das Kolloid koagulierte.^[65] Polymere NP weisen aber nicht immer eine homogene, glatte Oberfläche auf und können deshalb ein komplexeres Verhalten zeigen. An ihrer Oberfläche kann sich auch eine Schicht aus „Polymerhaaren“ befinden, d. h., lose Enden von Polymerketten treiben im umgebenden Medium („Haarschicht-Modell“).^[66] Die gestreckten Polymerketten kollabieren bei leichter Erhöhung der Elektrolytkonzentration in Richtung der Oberfläche. Damit nähert sich auch die Scherebene der Oberfläche und das Zetapotenzial steigt an. Bei hohen Ionenstärken tritt dann wieder die Kompression der Doppelschicht ein und das Zetapotenzial sinkt.^[29]

Entsprechend der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) wird in dieser Arbeit zwischen reversibler Flockung und der irreversiblen Aggregation (auch als Agglomeration oder Koagulation bezeichnet) unterschieden.^[67] Flocken sind demnach durch leichte mechanische Einwirkung (Schütteln, Rühren, kurzzeitiger Ultraschall usw.) wieder dispergierbar, da die Partikel keinen physikalischen Kontakt haben. Sind die Partikel jedoch im physikalischen Kontakt, lassen sich Aggregate nicht ohne Weiteres dispergieren.

Durch Charakterisierung und Kontrolle der Eigenschaften können NP gezielt und verlässlich in Anwendungen eingesetzt werden.

2.3. Biomedizinische Anwendbarkeit

Die biomedizinische Anwendbarkeit von PS-NP beruht auf ihren positiven Eigenschaften, da sie biokompatibel, bioadhäsiv, bioabbaubar und nicht toxisch sind (Abbildung 6). Ein wesentliches Merkmal ist ihre Zellgängigkeit.^[11,12] Die Zellaufnahme

wurde an NP auf Basis von hydrophoben Cellulosederivaten mit funktionellen Aminogruppen demonstriert, an denen ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden wurde.^[68] Die Zellen wiesen eine hohe Beladung mit markierten Partikeln nach ihrer Inkubation auf. In den Experimenten wurde die hohe Zellviabilität nach Behandlung mit den NP und damit ihre nicht toxische Eigenschaft bestätigt.

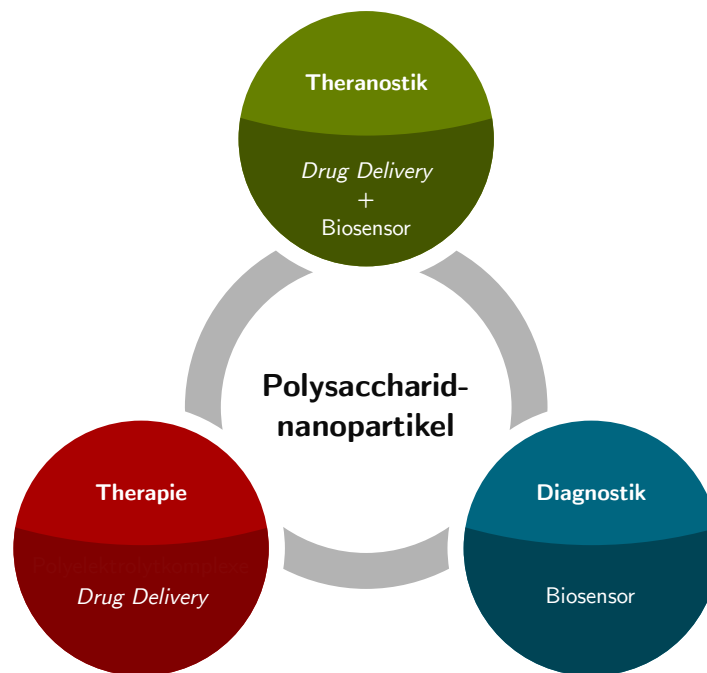


Abbildung 6. Übersicht der biomedizinischen Anwendbarkeit von Polysaccharid-nanopartikeln.

Aufgrund der genannten Vorteile werden PS-NP als Wirkstoffträger im Bereich des *Drug Delivery* untersucht. Verschiedene Wirkstoffe werden entweder kovalent an das Rückgrat gebunden und das Polymer zu NP umgeformt oder während der Partikelbildung physikalisch eingeschlossen. Eine Auswahl der Substanzen und der verwendeten Cellulosederivate ist in Tabelle 1 gezeigt. Celluloseether und -ester spielen gleichermaßen eine Rolle für diese Anwendung, wobei hydrophobe Cellulosederivate mit Carboxygruppen wie Carboxymethylcelluloseacetat (CMCA) und dessen Derivate oder Phthalate, Sebacate und Adipate vermehrt zum Einsatz kommen.^[44,48,69–77] Aufgrund der Carboxygruppen entlang des Rückgrats sind diese Polymere pH-sensitiv, d. h., sie sind bei einem pH-Wert von 6 bis 7 teilweise ionisiert und quellen im Wasser, während sie bei einem pH-Wert von 3 bis 4 unlöslich sind.^[70] Somit ist es möglich, die Freisetzung des Wirkstoffs aus dem NP durch einen Auslöser wie den pH-Wert zu kontrollieren. Außerdem verbessert die Einlagerung die Löslichkeit von Medikamenten, die schlecht wasserlöslich sind.^[69–71] Dies beruht zum einen auf der großen Oberfläche der NP und zum anderen auf der Polymermatrix, die die

Tabelle 1. Cellulosebasierte Nanopartikel im *Drug Delivery*.

Eigenschaft	Wirkstoff	Derivat ^a	Ref.
antiviral	Acyclovir	CMCAB	[69]
	Ritonavir, Efavirenz	CMCA, CAPr, CAPA, CAS, CAP	[70, 71]
	Dolutegravir	CAP	[72]
antimikrobiell	Zitronengrasöl	CA	[78]
antibiotisch	Ofloxacin	HEC, HPC	[79]
antitumoral	Podophyllotoxin	CMCA	[73, 74]
	Docetaxel	CMCA	[48]
	Cabazitaxel	CMCA	[44]
entzündungshemmend	Dexamethason	HPMCP, CAP, EC	[75, 80]
	Nimesulid	MC, EC	[81]
	Piroxicam	EC	[82]
	Curcumin	CMCAB	[76, 77]
antioxidierend	Vitamin C	EC	[83]

^a Carboxymethylcelluloseacetatbutyrat (CMCAB), Carboxymethylcelluloseacetat (CMCA), Celluloseacetatpropionat (CAPr), Celluloseacetatpropionatadipat (CAPA), Celluloseacetatsebacat (CAS), Celluloseacetatphthalat (CAP), Celluloseacetat (CA), Hydroxyethylcellulose (HEC), Hydroxypropylcellulose (HPC), Hydroxypropylmethylcellulosephthalat (HPMCP), Ethylcellulose (EC), Methylcellulose (MC).

Substanz im amorphen Zustand einschließt. PS mit Carboxygruppen ermöglichen zudem eine kovalente Fixierung der Wirkstoffe durch eine Esterbindung. Eine langsame und kontinuierliche Freisetzung des Wirkstoffs aus dem PS-NP wird dann im Organismus durch Esterasen erreicht, die die Esterbindung wieder spalten.^[44,73] Der zielgerichtete Transport von Medikamenten zum Wirkort wird durch die bioadhäsive Eigenschaft von PS unterstützt, da beispielsweise NP aus CA mit eingelagertem Wirkstoff eine bevorzugte Haftung an Schleimhäuten zeigen.^[78] Die Bioadhäsion beruht auf nicht kovalenten Bindungen von hydrophilen Gruppen (Hydroxy-, Amino- oder Carboxygruppen) des PS mit biologischen Strukturen.^[12]

Die zuvor erwähnte Zellgängigkeit verbunden mit einer Farbstoffmarkierung bildet die Grundlage für eine Anwendung von PS-NP als Biosensoren. Durch Modifizierung von PS wie Hyaluronan, Chitosan oder Dextran mit hydrophoben Gruppen und deren Selbstanordnung wurden PS-NP gewonnen, die nachträglich mit Cyaninfarbstoffen funktionalisiert werden konnten.^[84,85] Die Aufnahme der fluoreszenten Partikel in bestimmte Gewebe wie Tumore konnte sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* detektiert werden. Zudem war es möglich Bedingungen wie den pH-Wert im Cytosol einer Zelle mit PS-NP als Biosensoren zu messen.^[86,87] Dafür wurden zwei hydropho-

be Dextranderivate jeweils mit Fluorescein (Sensorfarbstoff), das eine pH-abhängige Fluoreszenzintensität zeigt, und Sulforhodamin B (Referenzfarbstoff), das eine stabile Fluoreszenz aufweist, funktionalisiert. Aus einer Mischung beider Derivate wurden durch Selbstanordnung Partikel erhalten, die in Zellen aufgenommen wurden und dort über das Fluoreszenzsignal die Messung des pH-Werts ermöglichten.

Zunehmend rückt auch die Kombination aus Behandlung mit Wirkstoffen (Therapie) und Bildgebung (Diagnostik) im Bereich der Theranostik in den Fokus der Forschung. PS-NP sind geeignete Materialien für diese Anwendung, da sie gleichzeitig den Transport eingeschlossener Wirkstoffe und die Detektion am Wirkort durch eine Farbstoffmarkierung erlauben.^[85]

Die angeführten Beispiele demonstrieren das Potenzial, das PS-NP als Biosensoren bergen. Trotzdem finden sie in Teilbereichen der *in vitro*-Diagnostik wie Immunassays bisher kaum Anwendung. Folglich besteht in diesem Bereich ein großer Forschungsbedarf. Die gezielte Funktionalisierung hydrophober PS-Derivate durch chemische Modifizierung unter dem Gesichtspunkt der spezifischen Anwendung von PS-NP ist dabei essenziell.

3. *Lateral Flow Immunoassay*

LFA sind immunologische Schnelltests, bei denen der Anwender einen bestimmten Analyten auf einem Teststreifen mittels Färbung direkt aus der Probe nachweisen kann. Sie bilden damit eine Gruppe innerhalb der Immunassays im Bereich der Bioanalytik. Im Gegensatz zu immunologischen Labormethoden wie dem *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) oder Western Blot zählen LFA zu den *Point of Care*-Methoden, d. h., der Nachweis eines Analyten wird direkt am Patienten bzw. Einsatzort durchgeführt. LFA liefern Analyseergebnisse mit hoher Sensitivität (üblicherweise im Bereich mehrerer ng ml^{-1} bis zu $0,1 \text{ pg ml}^{-1}$) und Selektivität in kurzer Zeit (1 bis 30 min).^[8] Die Schnelltests werden unter anderem in der klinischen Diagnostik sowie der Lebensmittel- und Umweltanalytik eingesetzt, in denen sie die Detektion einer Vielzahl von Analyten wie Pharmazeutika, Drogen, Pathogenen (Viren, Bakterien, Sporen, Parasiten), Metaboliten, Hormonen, Proteinen, Nukleinsäuresequenzen, Schwermetallen, Pestiziden oder Toxinen erlauben.^[6,8,88] Einer der bekanntesten LFA ist der Schwangerschaftstest. Neben dem breiten Anwendungsspektrum sind LFA einfach durchzuführen und zu transportieren, kostengünstig, stabil unter verschiedenen Umweltbedingungen und lange lagerbar.^[8]

3.1. Aufbau und Funktionsweise

Der LFA vereint zwei Prinzipien: (I) immunologische Markierung eines Analyten mit markiertem Antikörper (AK) und (II) dessen chromatographische Trennung von der restlichen Probe (z. B. Blut oder Urin).^[6] Der Teststreifen setzt sich aus mehreren Kissen mit unterschiedlichen Funktionen und einer Membran zusammen, die auf einer Trägerkarte fixiert sind (Abbildung 7).^[8,9] Die teilweise Überlappung der Kissen stellt den Durchfluss der Probe im gesamten Teststreifen sicher.^[88] Nachdem die Probe auf das Probenkissen aufgetragen wurde, durchwandert die flüssige Phase mit Analyten das Konjugatkissen, in dem das farbige NP-AK-Konjugat den Analyten bindet.^[6] Der markierte Analyt wird weiter durch die Membran transportiert. An der Testlinie sind primäre AK immobilisiert, die den farbstoffmarkierten Analyten binden und so eine Färbung der Testlinie hervorrufen (positiver Test). Danach binden sekundäre AK, immobilisiert an der Kontrolllinie, die primären AK des farbigen Konjugats und verursachen eine Färbung an der Linie. Diese Bindung erfolgt unabhängig von jeglichem Analyten. Die Kontrolllinie zeigt damit die einwandfreie Funktion des Tests an. Im Saugkissen wird die flüssige Probe schließlich aufgenom-

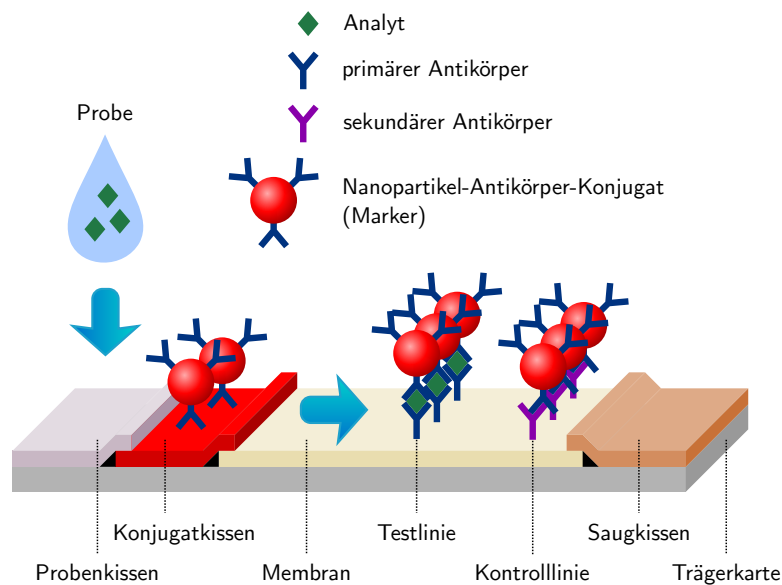


Abbildung 7. Schematischer Aufbau des *Lateral Flow Immunoassay*. Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[8,9]

men. Dabei befindet sich der Teststreifen im Inneren einer Kunststoffkassette, die durch Proben- und Lesefenster vom Anwender genutzt werden kann. Diese Ausführung des LFA, in der zwei AK denselben Analyten binden, wird als Sandwich-Format bezeichnet.^[6] Bietet der Analyt zwei oder mehr Epitope zur Bindung eines AK, kann das Sandwich-Format verwendet werden. In der Messung verursacht eine höhere Analytkonzentration eine intensivere Färbung der Testlinie.

Im Gegensatz dazu können Analyten mit einem Epitop nur im kompetitiven Format detektiert werden.^[6] Eine mögliche Ausführung stellt die Mischung von Probenanalyten und markierten Analyten dar, die um immobilisierte AK an der Testlinie konkurrieren. Eine andere Möglichkeit ist, dass markierte AK sowie Probenanalyten gemeinsam aufgetragen werden und immobilisierte Analyt-Protein-Konjugate an der Testlinie noch verbliebene freie markierte AK binden. Das erhaltene Signal verhält sich in beiden Fällen umgekehrt zur Analytkonzentration, d. h., je mehr Analyt aufgetragen wird, desto schwächer fällt die Testlinie aus.

3.2. Komponenten des Teststreifens

Die Materialien der einzelnen Bestandteile des LFA bieten Parameter, um Einfluss auf die Leistungsfähigkeit des Testsystems zu nehmen. Als Membran wird hauptsächlich Nitrocellulose genutzt, dessen Porengröße die kapillare Flusszeit der Probe bestimmt.^[6,8] Damit lässt sich die Reaktionszeit optimal einstellen, in der sich der Immunkomplex aus Antigen und AK bildet. Das Membranmaterial sollte möglichst

keine unspezifische Adsorption gegenüber Proteinen zeigen. Es werden auch andere Polymere wie Polyethylen, Polyethersulfon, Nylon oder Quarzglas als Membran eingesetzt. Proben- und Konjugatkissen bestehen meist aus Glasfaser oder Cellulose.^[6,8] Das Probenkissen ermöglicht eine Vorbereitung der Probe durch imprägnierte Verdickungsmittel oder Puffersalze. Zudem filtriert das Probenkissen grobe Bestandteile der Probe (z. B. Zellen im Blut) und hält sie zurück. Im Konjugatkissen werden markierte Moleküle zur Bioerkennung (z. B. Konjugat aus Farbstoff und AK) eingebracht und getrocknet.^[6,8] Die Konjugate sollen während der Lagerung stabil bleiben und bei Anwendung aus dem Kissen in den Flüssigkeitsstrom der Probe wieder freigesetzt werden. Cellulosefilter dienen als Saugkissen, die den kontinuierlichen Fluss der Probe durch die Membran aufrechterhalten.^[6,8]

Der Marker des LFA ist das entscheidende Element, da er das Signal in Abhängigkeit des Analyten erzeugt. Er basiert hauptsächlich auf einem Konjugat von farbigen bzw. fluoreszenten NP mit AK, das den Analyten spezifisch bindet. Zur Markierung des AK werden auch Enzyme oder Fluorophore eingesetzt.^[8] Jedoch benötigen Enzyme einen zusätzlichen Schritt nach erfolgtem Assay, bei dem ein Substrat durch enzymatische Reaktion zu einem Farbstoff umgesetzt wird. Fluorophore leiden unter Photobleichung sowie unter chemischer oder metabolischer Zersetzung. Im Gegensatz dazu bieten farbige NP einen weiteren Vorteil, da sie ein größeres Signal pro Bindungsereignis von Analyt und AK hervorrufen, als das beispielsweise bei der Markierung mit einem einzelnen Farbstoffmolekül pro AK der Fall ist. Die Sensitivität des Tests hängt zum einen vom Extinktionskoeffizienten des Markers und zum anderen von seiner Akkumulation an der Testlinie in Form des Immunkomplexes ab.^[8] Je intensiver die Färbung der Testlinie im Sandwich-Format, desto niedrigere (bessere) Nachweisgrenzen lassen sich realisieren. Gold-NP haben sich als Standard für Marker im LFA etabliert.^[6] Generell steigt die Signalstärke und damit die Sensitivität des Tests mit der Partikelgröße von 10 nm bis zu einem optimalen Bereich von 40 bis 80 nm an.^[89,90] Die Größenänderung von Gold-NP geht mit einer Änderung ihres Farbtons einher, verursacht durch eine Verschiebung des Absorptionsspektrums. Bei weiterer Vergrößerung der Gold-NP (150 nm) sinkt die Signalstärke wieder ab, verursacht durch eine weite Rotverschiebung der Absorption in einen Bereich, in dem das menschliche Auge weniger empfindlich ist.^[90] Andere Marker wie Latex-, Kohlenstoff- und Selenpartikel oder auch fluoreszente Partikel, Quantenpunkte und *Upconverting Phosphors* werden mitunter in LFA genutzt.^[6,8] Polystyrol-NP (*Latex Beads*) zeigen das intensivste Signal bei einer Größe von 300 nm, wohingegen 800 nm große Partikel ein schwächeres Signal ergeben.^[91] Die eingeschränkte Diffusion größerer Partikel durch die Membran begrenzt die Leistung und kann nur teilweise durch Anpassung der Membranporengröße kompensiert werden. Demzufolge liegen die Detektionsgrenzen von LFA mit Polystyrol-NP vergleichsweise höher als bei anderen Markern.^[9]

PS-NP fanden in LFA bisher kaum Anwendung, besitzen aber großes Potenzial als Marker.^[92,93] Sie lassen sich einfach und schnell mit definiertem Durchmesser

herstellen, erlauben die Einlagerung hydrophober Substanzen (z. B. Farbstoffe) und die Anbindung weiterer funktioneller Moleküle (z. B. AK). Voraussetzung dafür ist jedoch eine gezielte chemische Modifizierung hydrophober PS-Derivate. Das Ziel bei der Entwicklung von PS-NP für die Anwendung in Immunassays ist zum einen ihre intensive Färbung und zum anderen eine funktionale Oberfläche, die hohe Ausbeuten bei der Kopplung mit AK erlaubt.

4. Synthese von Celluloseestern

Die Veresterung von PS wie Cellulose stellt eine effiziente Methode dar, funktionelle Gruppen mit einer stabilen Esterbindung an das Polymerrückgrat anzubinden.^[17,18,94] Die Wiederholungseinheit der Cellulose besitzt eine primäre sowie zwei unterschiedliche sekundäre Hydroxygruppen, die mit Carbonsäuren verestert werden können. Dafür muss die Carboxygruppe der Carbonsäure aktiviert werden. Die folgenden Methoden erlauben es, den DS des Esters kontrolliert einzustellen und in Bezug auf die Zielstellung dieser Arbeit das PS gezielt mit hydrophoben und/oder reaktiven Gruppen auszustatten.

4.1. Aktivierung der Carboxygruppe mit Carbodiimid

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) ist ein typisches Reagenz, um Carbonsäuren zu aktivieren und anschließend mit einem Nukleophil umzusetzen. Der gebildete *O*-Acylisoharnstoff reagiert leicht mit nukleophilen Aminen zum Amid. Bei alleinigem Einsatz von DCC wird der Ester jedoch in geringen Ausbeuten erhalten, da der Alkohol weniger nukleophil ist.^[95] Deshalb werden zusätzlich Acylüberträger wie 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP) bei der Reaktion als Katalysatoren eingesetzt. Diese Aktivierungsmethode ist in der Literatur auch als Steglich-Veresterung bekannt.^[96] Alternativ dient das noch effizientere und strukturell ähnliche 4-(1-Pyrrolidiny)l-pyridin (4-PP) als Acylüberträger.^[97] Mithilfe der Katalysatoren und DCC lassen sich Ester aus komplexen, sterisch anspruchsvollen oder hydrophoben Carbonsäuren und PS gewinnen.^[17] Darüber hinaus etablierte sich DCC aus diesem Grund zur Kopplung von Biomolekülen sowie in der Proteinchemie.

Im Mechanismus der Reaktion addiert zunächst die Hydroxygruppe der Säure an DCC und bildet den *O*-Acylisoharnstoff (Abbildung 8).^[98] *O*-Acylisoharnstoff reagiert dann mit einem weiteren Äquivalent Säure zum Säureanhydrid und *N,N*-Dicyclohexylharnstoff.^[17,99] 4-PP greift nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Anhydrids an und es bildet sich das *N*-Acylpyridiniumcarboxylat. Der Elektronenzug des Pyridinium-Ions aktiviert die Acylgruppe und ermöglicht den nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe des PS-Rückgrats am Carbonylkohlenstoff. Dabei spielt aber auch die erhöhte Aufweitung des Ionenpaares eine Rolle, da Kation und Anion des *N*-Acylpyridiniumcarboxylats mesomeriestabilisiert sind. Damit ist das *N*-Acylpyridinium-Kation für einen Angriff des Nukleophils (Hydroxygruppe am PS-Rückgrat) besser zugänglich und das Carboxylat-Anion abstrahiert währenddessen

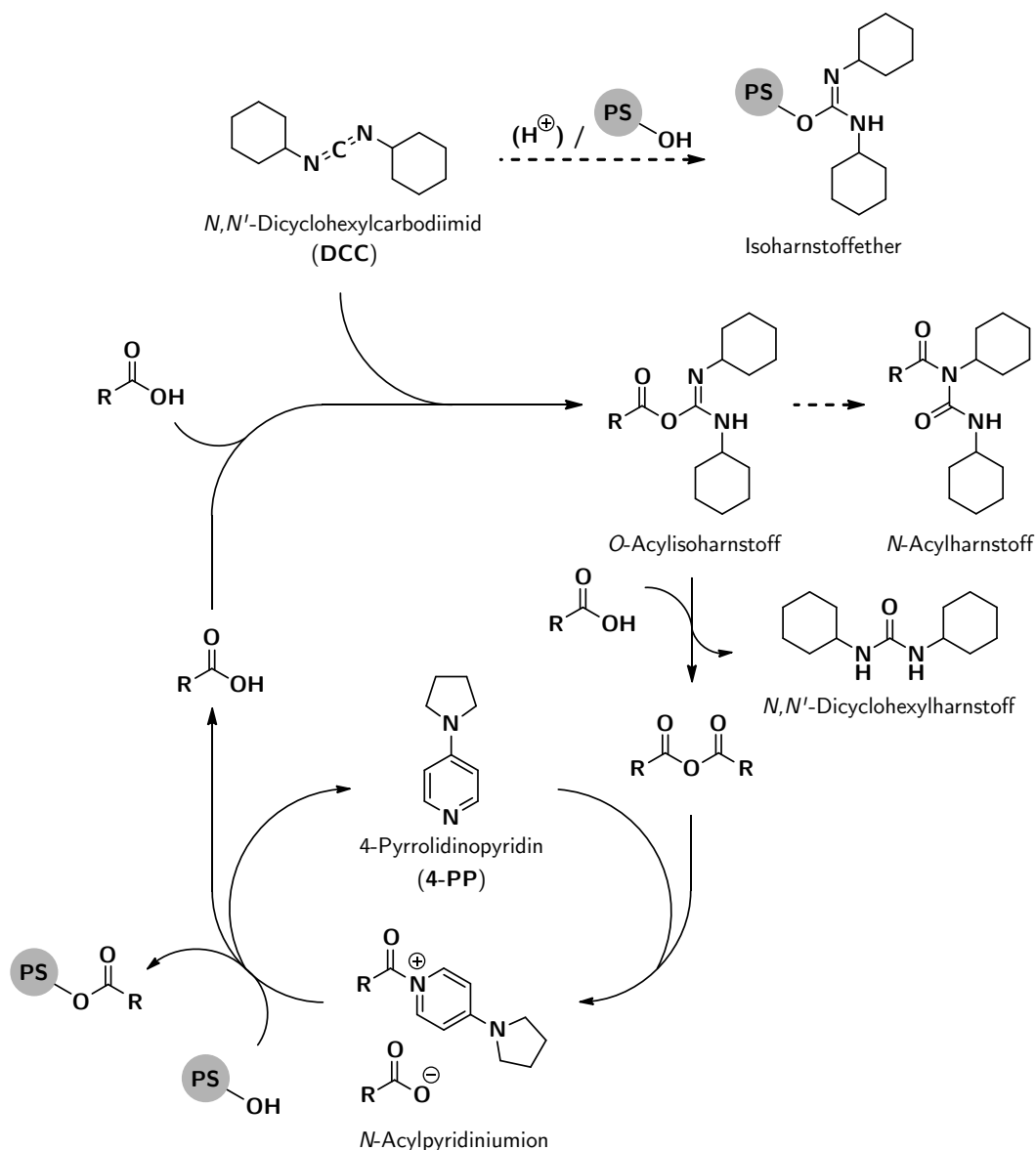


Abbildung 8. Reaktionsschema der Veresterung von Polysacchariden (PS) mit *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-(1-Pyrrolidinyl)pyridin (4-PP). Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[17,95,98–100]

das Proton der Hydroxygruppe.^[97] Der PS-Ester entsteht und ein Äquivalent Carbonsäure sowie 4-PP werden zurückgebildet.

Die Steglich-Veresterung von PS mit DCC wird oft in Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylformamid (DMF) oder *N,N*-Dimethylacetamid (DMA) durchgeführt. In DMSO ist eine mögliche Nebenreaktion zu beachten, bei der die Moffatt-Oxidation der Hydroxygruppen am PS zu Aldehyden führt.^[17,101] Trotz der effizienten Dar-

stellung von Estern bringt DCC auch Nachteile mit sich. Zum einen muss die Toxizität des Reagenzes im Rahmen einer biologischen Anwendung beachtet werden, zum anderen lassen sich das erhaltene Polymer und der schlecht lösliche *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff unter Umständen schwer voneinander trennen. Wird die Reaktion in DMSO oder DMF durchgeführt, kann der Harnstoff jedoch abfiltriert werden.^[17,102] Darüber hinaus können weitere Nebenreaktionen auftreten (Abbildung 8). Es ist möglich, dass sich DCC mit der Hydroxygruppe am PS-Rückgrat zum Isoharnstoffether umsetzt.^[17,100] Die Umlagerung des *O*-Acylisoharnstoffs ergibt *N*-Acylharnstoff, wird aber durch Zusatz des Acylüberträgers weitgehend unterdrückt.^[98]

4.2. Aktivierung der Carboxygruppe mit Iminiumchlorid

Carbonsäuren lassen sich *in situ* mit Iminiumchlorid aktivieren und zu strukturell vielfältigen Estern in hohen Ausbeuten umsetzen.^[103] Vor allem hydrophobe sowie sterisch anspruchsvolle Säuren werden mit PS auf diese Weise verestert und PS-Ester mit hoher Reinheit gewonnen.^[17,104–107] Die Reaktion verläuft unter milden Bedingungen. Entsprechend der Darstellung des Vilsmeier-Reagenzes wird zuerst DMF bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit Oxalylchlorid (OC) *in situ* zum Iminiumchlorid umgesetzt (Abbildung 9). Das Iminiumchlorid reagiert mit der Carbonsäure zum Säureiminiumchlorid. Die Hydroxygruppe des PS greift am aktivierten Carbonylkohlenstoff an und der Ester bildet sich. Die Aufarbeitung des Produkts wird erheblich vereinfacht, da bei der Umsetzung nur gasförmige Nebenprodukte (CO, CO₂ und HCl) anfallen und DMF regeneriert wird.^[17,108] Andere denkbare Nebenreaktionen wie Chlorierung, Oxidation oder Säurechloride wurden nicht beobachtet. Die schonenden Reaktionsbedingungen verursachen keinen nennenswerten Abbau des PS-Rückgrats.

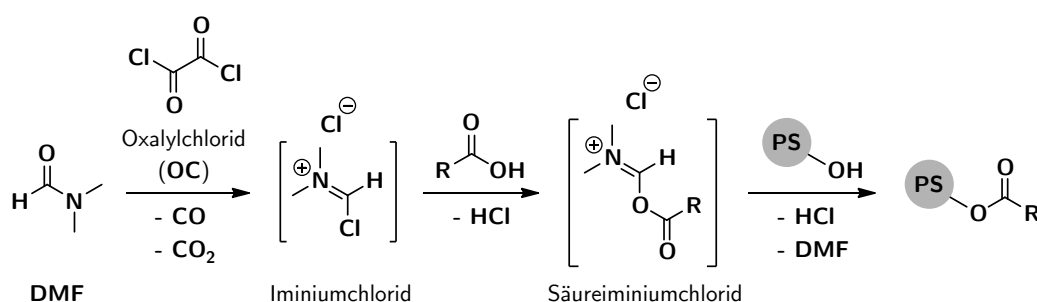


Abbildung 9. Reaktionsschema der Veresterung von Polysacchariden (PS) mit Iminiumchlorid, *in situ* erzeugt aus Oxalylchlorid (OC) und *N,N*-Dimethylformamid (DMF). Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[17,104]

4.3. Aktivierung der Carboxygruppe mit Tosylchlorid

Carbonsäuren lassen sich *in situ* mit Sulfonsäurechloriden wie Tosylchlorid (TosCl) oder Mesylchlorid aktivieren und mit PS zum Ester umsetzen. Die Methode erlaubt es, hydrophobe und sterisch gehinderte Carbonsäuren mit PS zu verestern.^[17,109–113] Im Reaktionsverlauf bildet sich zunächst neben dem gemischten Anhydrid aus TosCl und Carbonsäure auch das symmetrische Anhydrid der Carbonsäure und das Carbonsäurechlorid (Abbildung 10).^[17,114] Die hohe Reaktivität des Systems ist auf die Bildung dieser drei aktivierten Formen der Carbonsäure zurückzuführen. Die Hydroxygruppe des PS reagiert mit der aktivierten Carbonsäure zum entsprechenden PS-Ester und es bilden sich als Nebenprodukte *p*-Toluolsulfonsäure, HCl sowie zurückgebildete Carbonsäure. Temperatur, Sulfonsäurechlorid und die Konzentration der zugesetzten Base üben einen Einfluss auf die Reaktion aus.^[17,114] Bei Verwendung von Pyridin wird die Bildung von reaktiven *N*-Acylpyridinium-Salzen während der Veresterung angenommen. Wird TosCl in Lösungsmitteln wie DMA/LiCl oder DMF/LiCl verwendet, läuft die Reaktion auch ohne zugesetzte Base ab und liefert PS-Ester bis zu einer vollständigen Funktionalisierung (DS = 3,0).^[17,115] Die Aktivierung von Carbonsäuren mit Sulfonsäurechloriden ist experimentell einfach durchzuführen, dem gegenüber steht aber ein ausgeprägter Polymerabbau während der Reaktion.^[17] Zudem ist eine intensive Reinigung der Produkte durch Fällern in Alkohol (z. B. Ethanol, Isopropanol), Umfällen und eventueller Soxhlet-Extraktion nötig.

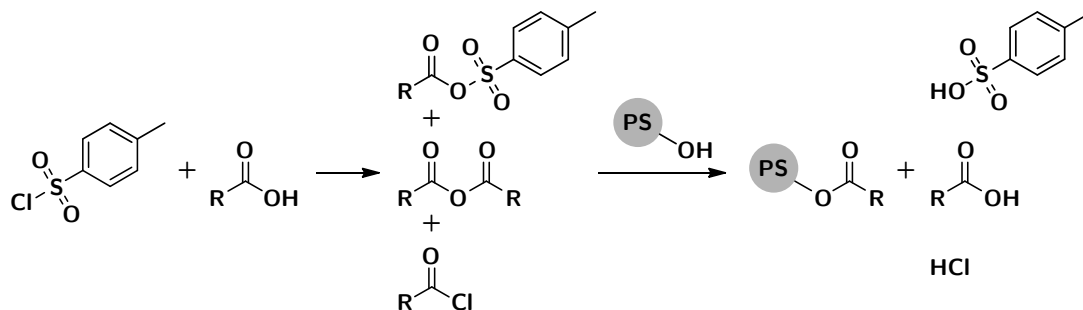


Abbildung 10. Reaktionsschema der Veresterung von Polysacchariden (PS) mit Tosylchlorid, das die Carbonsäure *in situ* aktiviert. Eigene Darstellung, basierend auf der Literatur.^[17]

Teil II.

Spezieller Teil

5. Kompositnanopartikel aus Celluloseestern und Farbstoffen*

Es wurde untersucht, wie gefärbte Komposit-NP durch Einlagerung verschiedener hydrophober Farbstoffe in eine PS-Matrix erhalten werden können. Hierzu wurden zwei NP-bildende PS-Derivate, CA und CAP, sowie zwei Verfahren zur Partikelherzeugung, Dialyse und Eintropfmethode, genutzt. CAP verfügt über funktionelle Carboxygruppen, die zur Kopplung der NP mit AK genutzt werden sollten. CA wurde als Referenzmaterial in die Experimente einbezogen, um zu untersuchen, welchen Einfluss Carboxygruppen auf die Partikelbildung sowie die Farbstoffeinlagerung haben.

5.1. Herstellung und Charakterisierung

Es wurden NP aus CA und CAP durch zwei Verfahren der Lösungsmittelverdrängung – Dialyse und Eintropfmethode – hergestellt. Dabei wurden verschiedene wasserunlösliche Farbstoffe beigemischt. Sowohl der Einfluss der Celluloseester als auch der Farbstoffe auf die gebildeten Komposit-NP wurde untersucht. Die Partikel wurden umfassend charakterisiert, um Verfahren zur Herstellung gefärbter Komposit-NP zu entwickeln.

5.1.1. Dialyse

In ersten Versuchen wurden NP aus Celluloseestern in Abwesenheit eines Farbstoffs mittels Dialyse hergestellt. CAP ist ein hydrophober Mischester, der Carboxygruppen enthält. Die Protonierung des anionischen Polyelektrolyts ist abhängig vom pH-Wert der Umgebung. Die Carboxygruppen können aktiviert werden und ermöglichen die kovalente Bindung mit AK, die als Grundlage für die spätere Anwendung in LFA dienen. Sie tragen auch dazu bei, AK elektrostatisch bzw. adsorptiv auf der Oberfläche der NP zu binden. CA als ungeladener Celluloseester wurde vergleichend

*Dieses Kapitel basiert auf der Publikation *Incorporation of Hydrophobic Dyes within Cellulose Acetate and Acetate Phthalate Based Nanoparticles* von Peter Schulze, Martin Gericke, Friedrich Scholz, Holger Wondraczek, Peter Miethe und Thomas Heinze, veröffentlicht in *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, 217, 1823–1833.

in die Experimente einbezogen, um den Einfluss der Carboxygruppe auf Partikeleigenschaften und Einlagerung der Farbstoffe zu bestimmen. Beide Celluloseester wurden in DMA mit Massenkonzentrationen von 2 bis 8 mg ml⁻¹ gelöst und gegen das Fällungsmittel Wasser dialysiert. Die erhaltenen trüben wässrigen Partikelsuspensionen wurden hinsichtlich der Morphologie, des Partikeldurchmessers, des PDI und des Zetapotenzials charakterisiert (Tabelle 2).

Tabelle 2. Bedingungen und Ergebnisse der Herstellung wässriger Partikelsuspensionen aus Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetatphthalat (CAP) mittels Dialyse.

Nr.	Celluloseester	β_{Polymer}^a mg ml ⁻¹	d^b nm	PDI ^b	ζ^b mV
CA-NP 1	CA	2	281 ± 3	0,14 ± 0,01	-28,8 ± 0,2
CA-NP 2	CA	4	387 ± 2	0,13 ± 0,02	-27,5 ± 0,9
CA-NP 3	CA	6	393 ± 4	0,11 ± 0,02	-29,4 ± 0,2
CA-NP 4	CA	8	372 ± 4	0,14 ± 0,01	-32,1 ± 0,3
CAP-NP 1	CAP	2	293 ± 6	0,08 ± 0,04	-33,6 ± 0,3
CAP-NP 2	CAP	4	336 ± 2	0,13 ± 0,02	-39,6 ± 0,1
CAP-NP 3	CAP	6	434 ± 4	0,18 ± 0,03	-43,1 ± 0,9
CAP-NP 4	CAP	8	484 ± 7	0,14 ± 0,02	-45,6 ± 0,5

^a Massenkonzentration des Polymers (β_{Polymer}) in einer Lösung in *N,N*-Dimethylacetamid vor der Dialyse.

^b Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d), Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotenzial (ζ) der Nanopartikel, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung.

CAP formte unabhängig von der Konzentration Partikel im Nanometerbereich mit einer gleichmäßig sphärischen Form (Abbildung 11a). Das untersuchte anionische PS-Derivat verhält sich damit ähnlich wie zuvor beschriebene ungeladene und kationische PS, die auch sphärische NP durch Dialyse ausbilden.^[39,68] Die REM-Aufnahmen zeigen unter anderem einen kleinen Anteil von verlängerten Partikeln, die jedoch wahrscheinlich nicht während der Dialyse gebildet wurden. Zum einen besitzt der Großteil der Partikel eine regelmäßige Form und zum anderen entspricht die Anordnung der verlängerten Partikel dem Muster der umgebenden Partikel. Der Zusammenschluss der Partikel wird auf die Probenpräparation für die REM-Messung zurückgeführt. Während der Präparation kann die Trocknung der aufgetragenen Suspension bewirken, dass sich eng beieinander liegende Partikel verbinden. Ähnlich deformierte Partikel wurden bereits in REM-Aufnahmen von NP beobachtet, die aus anderen PS gewonnen wurden.^[68,116,117]

Die Erhöhung der Polymerkonzentration von CAP verursachte eine sukzessive Vergrößerung der Partikelgröße von 293 nm (2 mg ml⁻¹) zu 484 nm (8 mg ml⁻¹). Offensichtlich ist die Bildung größerer Partikel bevorzugt, wenn höhere Konzentrationen

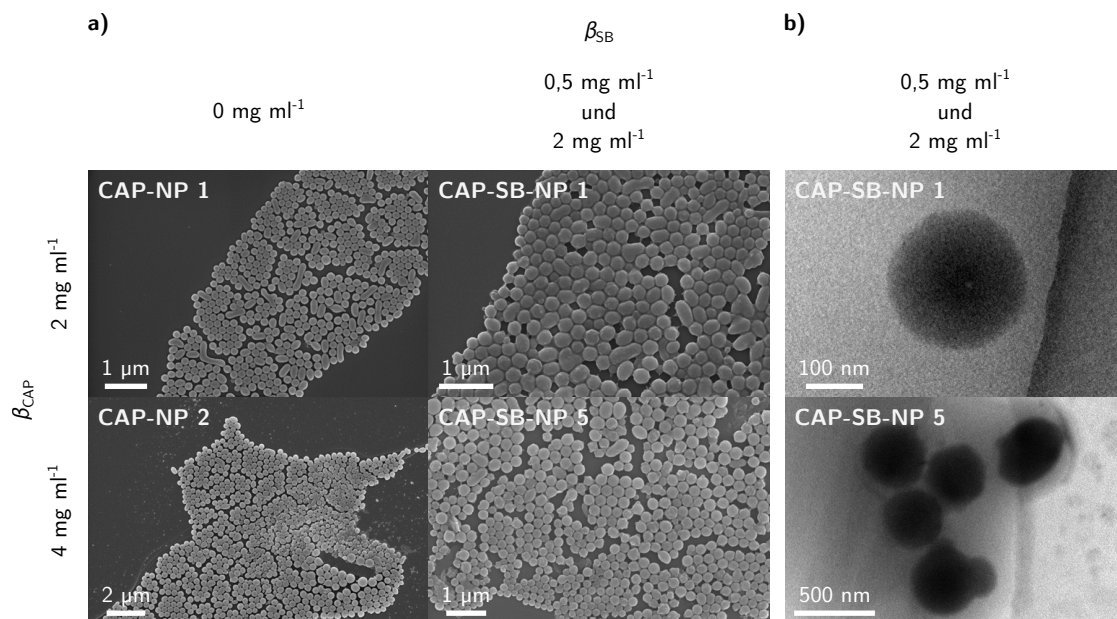


Abbildung 11. a) REM-Aufnahmen von Nanopartikeln, hergestellt aus Celluloseacetatphthalat (CAP) ohne und mit eingelagertem Sudanschwarz B (SB) sowie b) Kryo-TEM-Aufnahmen von Nanopartikeln, hergestellt aus CAP mit eingelagertem SB bei verschiedenen Massenkonzentrationen (β).

nen des Celluloseesters während der Selbstanordnung vorliegen. Dies wurde auch schon in früheren Arbeiten festgestellt, in denen andere Cellulosemischester zu NP umgeformt wurden.^[39,43] Es entspricht ebenfalls den Mechanismen der Bildung von NP durch Nukleation und Wachstum sowie Nukleation und Aggregation (siehe Abschnitt 2.1).^[42] Die steigende Übersättigung der Polymerlösung während der Dialyse führt dazu, dass Makromoleküle aufgrund von Fluktuationen in der Konzentration nukleieren (Nukleation). Die gebildeten Nuklei wachsen, indem sie entweder weitere Makromoleküle aus der Lösung adsorbieren (Wachstum) oder mit anderen Nuklei aggregieren, verursacht durch eine ausreichende Anzahl von Nuklei im Medium. Deshalb vergrößerte sich der durchschnittliche Partikeldurchmesser und die Größenverteilung mit steigender Polymerkonzentration. Der Zetapotenzialbetrag der CAP-NP stieg von -34 mV (2 mg ml^{-1}) auf -46 mV (8 mg ml^{-1}) mit zunehmender Polymerkonzentration. Für die Ausbildung von elektrischen Ladungen auf kolloidalen Partikeln wurden bereits verschiedene Gründe diskutiert.^[64] Im Fall von CAP-NP tragen ionogene Carboxygruppen zum Zetapotenzial bei, indem sie an der Oberfläche im wässrigen Medium leicht dissoziieren. Damit lässt sich die Zunahme des Zetapotenzialbetrags von CAP-NP erklären, da sie bei zunehmenden Durchmesser eine größere Oberfläche mit einer höheren Anzahl an Carboxygruppen präsentieren. Daneben leisten auch andere Effekte einen Beitrag zum Zetapotenzial der CAP-NP (siehe CA-NP im folgenden Absatz).

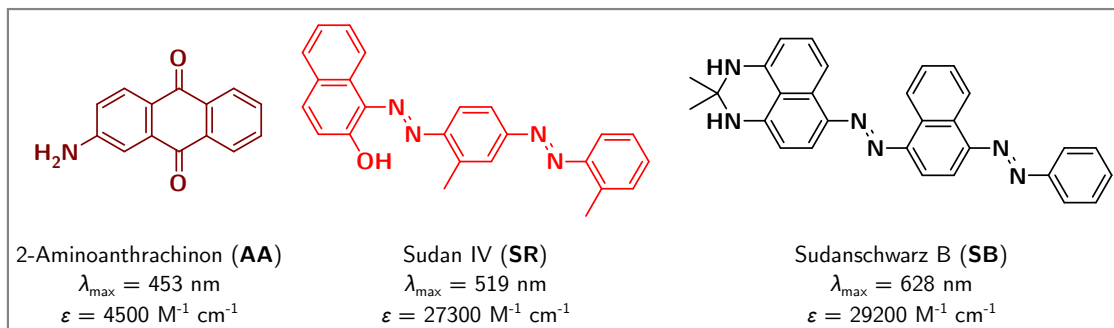
Mit steigender Polymerkonzentration vergrößerte sich der Partikeldurchmesser der CA-NP von 281 nm (2 mg ml^{-1}) zu einem Grenzwert von ca. 370 bis 390 nm ($\geq 4 \text{ mg ml}^{-1}$). Im Gegensatz zum Durchmesser waren die Breite der Verteilung ($\text{PDI} \approx 0,13$) und das durchschnittliche Zetapotenzial ($\approx -30 \text{ mV}$) weniger abhängig von der Konzentration des CA. Für CA-NP, die eine nicht ionogene Oberfläche präsentieren, ist die vorzugsweise Adsorption von Hydroxidionen plausibel, die damit ein negatives Zetapotenzial verursachen.^[64] Es wird jedoch auch die Spaltung von Acetatgruppen auf der Oberfläche als möglicher Grund für eine negative Ladung angeführt.^[65] Im Gegensatz zu CAP-NP zeigten CA-NP ein Plateau im Verlauf der Partikelgröße und ein relativ konstantes Zetapotenzial. Diese Unterschiede lassen sich auf die andere Struktur des CA zurückführen. An CA sind keine ionogenen Carboxygruppen vorhanden, die CAP jedoch aufweist. Aus diesem Grund sind die Partikel unterschiedlich durch das Zetapotenzial stabilisiert, was sich auch auf die Partikelgrößen auswirken kann.

Im Folgenden wurde die Einlagerung von Farbstoffen während der Bildung von Partikeln aus CA und CAP untersucht, um farbige Komposit-NP zu gewinnen (Abbildung 12). Die Farbstoffe 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) und Sudan schwarz B (SB) wurden für die Experimente ausgewählt, da sie verschiedene Bedingungen erfüllen. Sie sind hydrophobe Substanzen und demgemäß in aprotisch polaren Lösungsmitteln wie DMA löslich, während sie in Wasser unlöslich sind. Aus diesem Grund sind die Farbstoffe für die Einlagerung mittels Dialyse geeignet. Zudem bildet ihr Farbton wie braun (AA), rot (SR) und schwarz (SB) einen starken Kontrast mit dem weißen Hintergrund eines LFA-Streifens. Das ermöglicht eine visuell einfache Detektion in der späteren Anwendung.

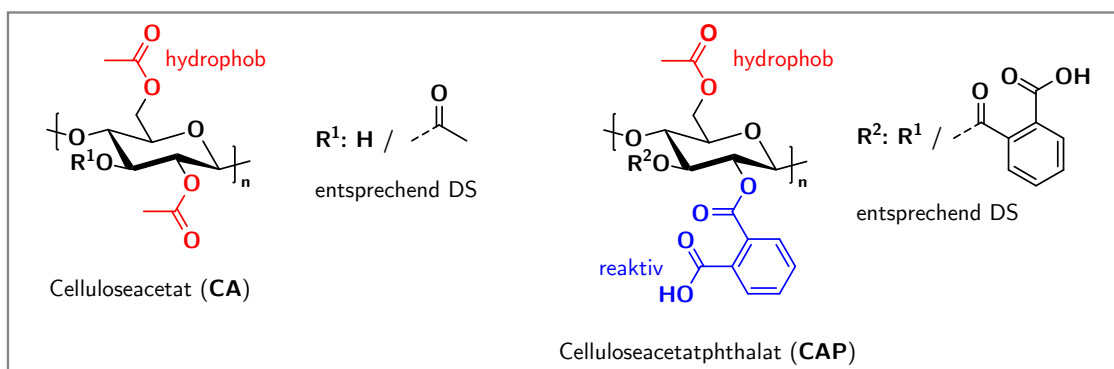
Es wurden Celluloseester mit den entsprechenden Farbstoffen in bestimmten Verhältnissen in DMA gelöst. Die erhaltenen Lösungen wurden gegen das Fällungsmittel Wasser dialysiert, um Komposit-NP zu gewinnen (Tabelle 3 und 4). Dabei variierten die Zeiten, bis die Lösung während der Dialyse erkennbar trüb wurde. Lösungen der Derivate mit AA blieben für ca. 15 min transparent, bevor sich allmählich eine trübe Suspension bildete. Dies ist vergleichbar zu den Lösungen der reinen Derivate, deren Selbstanordnung nach 10 min (CA) und 15 min (CAP) stattfand. Jedoch erfolgte die Selbstanordnung für Mischungen der Derivate mit SR viel schneller und bereits nach etwa 5 min war eine Trübung zu erkennen. Für Mischungen mit SB war eine Trübung nicht sichtbar, da bei den verwendeten Mengen an Farbstoff eine tiefschwarze Färbung der Lösungen vorlag.

Bei der Dialyse der Lösung aus Celluloseester und jeweiligem Farbstoff wurden generell tief gefärbte Partikelsuspensionen erhalten. Sie waren entsprechend stabil gegen Sedimentation und aggregierten nicht unter mechanischer Einwirkung (z. B. Schütteln, Zentrifugation). Weiterhin entfärbten sich die Partikel nicht. Eine Entfärbung würde auf eine chemische Veränderung der Farbstoffe oder eine Farbstoffmigration in die wässrige Phase hinweisen. Es war möglich vergleichsweise hohe Beladungen der Komposit-NP mit Farbstoff bis zu einem Massenanteil von 50 % zu

Hydrophober Farbstoff



Celluloseester



Dialyse



Selbstanordnung

Kompositnanopartikel



Abbildung 12. Schematische Darstellung der Einlagerung von hydrophoben Farbstoffen 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) und Sudanschwarz B (SB) in Nanopartikeln (NP) aus Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetatphthalat (CAP) mittels Dialyse. Die spektralen Eigenschaften der Farbstoffe wurden in *N,N*-Dimethylacetamid bestimmt.

erzielen. In anderen cellulosebasierten Systemen wurde dies mit Wirkstoffen mittels Eintropfmethode bzw. *Multi Inlet Vortex Mixer* erreicht.^[76,77,82,83,118] Typische Beladungen liegen jedoch bei niedrigeren Werten bis zu 10 %.^[69,71,72,75,78,80,81] Die Dialyse der Lösung des entsprechenden Farbstoffs ohne einen Celluloseester lieferte nur einen aggregierten Niederschlag. Dieser Befund spricht eindeutig für den erfolgreichen Einschluss des Farbstoffs in die stabilisierende Matrix des Celluloseesters während der Partikelbildung. Die Komposit-NP zeigten eine sphärische Gestalt ähnlich der Morphologie der Partikel, die nur aus den Celluloseestern gewonnen wurden (Abbildung 11a). Der innere Aufbau der Komposit-NP wies keine *Core-Shell*-Struktur auf (Abbildung 11b). Der Farbstoff SB ist gleichmäßig im Partikel verteilt und seine Struktur entspricht damit einer kompakten Nanosphäre.

Der Einschluss von AA in CA-NP führte zu ähnlichen Partikelgrößen und Zetapotenzialen im Vergleich mit ungefärbten CA-NP (Tabelle 3). Bei einer niedrigen Polymerkonzentration von 2 mg ml^{-1} (**CA-AA-NP 1** und **CA-AA-NP 2**) wiesen die Komposit-NP einen durchschnittlichen Durchmesser um 270 nm und ein Zetapotenzial um -29 mV auf, das den unbeladenen **CA-NP 1** entspricht. Jedoch erhöhte sich der PDI von $\approx 0,14$ auf $\approx 0,20$ durch den Einschluss von AA. Bei höherer Polymerkonzentration von 4 mg ml^{-1} trat ein ähnlicher Effekt hervor. Die Komposit-NP (**CA-AA-NP 3**) besaßen einen durchschnittlichen Durchmesser von 394 nm und ein Zetapotenzial von -30 mV , das mit unbeladenen **CA-NP 2** vergleichbar ist. Wieder war eine leichte Verbreiterung der Größenverteilung festzustellen, da der PDI von $\approx 0,13$ (**CA-NP 2**) auf $\approx 0,24$ (**CA-AA-NP 3**) stieg. Offensichtlich hat AA nur einen geringen Einfluss auf die Selbstanordnung von Komposit-NP aus CA.

Der Einschluss von AA in CAP-NP beeinflusste die Partikeleigenschaften geringfügig (Tabelle 4). Der durchschnittliche Durchmesser der Komposit-NP (**CAP-AA-NP 1** und **CAP-AA-NP 2**) bei niedriger Polymerkonzentration (2 mg ml^{-1}) war mit ca. 200 nm etwas kleiner verglichen zu ungefärbten **CAP-NP 1** (293 nm), während der PDI mit 0,07 bis 0,08 unverändert blieb und eine ähnliche Größenverteilung widerspiegelte. Auch das Zetapotenzial blieb mit ca. -34 mV nahezu konstant. Bei höherer Polymerkonzentration (4 mg ml^{-1}) blieb die Partikelgröße mit 331 nm (**CAP-AA-NP 3**) auch unverändert. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen, die durch den Einschluss der Sudanfarbstoffe erzielt wurden. Die Größenverteilung wurde leicht breiter mit einem PDI von $\approx 0,21$ (**CAP-AA-NP 3**), ausgehend von $\approx 0,13$ (**CAP-NP 2**). Der Betrag des Zetapotenzials von -40 mV (**CAP-NP 2**) sank auf einen Grenzwert von -33 mV (**CAP-AA-NP 3**), was auch den Komposit-NP bei niedrigen Polymerkonzentrationen entsprach. Dieser Befund wird durch eine Wechselwirkung der Carboxygruppen des CAP mit den primären Aminogruppen des AA erklärt. So kann es durch den Einschluss des AA zu einer teilweisen Maskierung der Carboxygruppen und einer Senkung des Zetapotenzialbetrags kommen.^[119]

Anders als AA führte der Einschluss von SR in CA- und CAP-NP zu veränderten Partikelgrößen. CA-NP mit eingelagertem SR zeigten bei niedriger Polymerkonzentration von 2 mg ml^{-1} (**CA-SR-NP 1**, **CA-SR-NP 2** und **CA-SR-NP 3**) einen

Tabelle 3. Bedingungen und Ergebnisse der Herstellung wässriger Partikelsuspensionen aus Celluloseacetat (CA) mit den eingelagerten Farbstoffen 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) und Sudanschwarz B (SB) mittels Dialyse.

Nr.	Celluloseester	β_{Polymer}^a mg ml ⁻¹	Farbstoff	$\beta_{\text{Farbstoff}}^a$ mg ml ⁻¹	$w_{\text{Farbstoff}}^b$ %	d^c nm	PDI ^c	ζ^c mV
CA-AA-NP 1	CA	2	AA	1	33	270 ± 2	0,18 ± 0,03	-29,4 ± 0,9
CA-AA-NP 2	CA	2	AA	2	50	269 ± 2	0,21 ± 0,04	-28,8 ± 0,5
CA-AA-NP 3	CA	4	AA	2	33	394 ± 3	0,24 ± 0,01	-30,1 ± 0,8
CA-SR-NP 1	CA	2	SR	0,5	20	329 ± 6	0,18 ± 0,01	-27,7 ± 1,1
CA-SR-NP 2	CA	2	SR	1	33	445 ± 2	0,15 ± 0,01	-30,5 ± 0,6
CA-SR-NP 3	CA	2	SR	2	50	620 ± 2	0,14 ± 0,01	-30,4 ± 0,2
CA-SR-NP 4	CA	4	SR	1	20	624 ± 4	0,37 ± 0,02	-31,3 ± 0,9
CA-SR-NP 5	CA	4	SR	2	33	639 ± 6	0,19 ± 0,03	-30,7 ± 0,6
CA-SR-NP 6	CA	4	SR	4	50	762 ± 24	0,17 ± 0,05	-30,1 ± 0,3
CA-SB-NP 1	CA	2	SB	0,5	20	583 ± 11	0,22 ± 0,01	-26,9 ± 0,8
CA-SB-NP 2	CA	2	SB	1	33	1285 ± 32	0,28 ± 0,03	-27,0 ± 0,4
CA-SB-NP 3	CA	2	SB	2	50	1455 ± 61	0,26 ± 0,04	-26,7 ± 0,9
CA-SB-NP 4	CA	4	SB	1	20	1011 ± 14	0,21 ± 0,01	-30,2 ± 0,9
CA-SB-NP 5	CA	4	SB	2	33	1554 ± 46	0,36 ± 0,07	-29,8 ± 0,8
CA-SB-NP 6	CA	4	SB	4	50	1911 ± 36	0,30 ± 0,01	-25,9 ± 0,2

^a Massenkonzentration des Polymers (β_{Polymer}) und des Farbstoffs ($\beta_{\text{Farbstoff}}$) in einer Lösung in *N,N*-Dimethylacetamid vor der Dialyse.

^b Massenanteil des Farbstoffs ($w_{\text{Farbstoff}}$), bezogen auf den Gesamtfeststoffgehalt.

^c Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d), Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotenzial (ζ) der Nanopartikel, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung.

Tabelle 4. Bedingungen und Ergebnisse der Herstellung wässriger Partikelsuspensionen aus Celluloseacetatphthalat (CAP) mit den eingelagerten Farbstoffen 2-Aminoantrachinon (AA), Sudan IV (SR) und Sudan schwarz B (SB) mittels Dialyse.

Nr.	Celluloseester	β_{Polymer}^a mg ml ⁻¹	Farbstoff	$\beta_{\text{Farbstoff}}^a$ mg ml ⁻¹	$w_{\text{Farbstoff}}^b$ %	d^c nm	PDI ^c	ζ^c mV
CAP-AA-NP 1	CAP	2	AA	1	33	206 ± 2	0,07 ± 0,02	-33,8 ± 1,7
CAP-AA-NP 2	CAP	2	AA	2	50	204 ± 1	0,08 ± 0,03	-35,7 ± 4,0
CAP-AA-NP 3	CAP	4	AA	2	33	331 ± 1	0,21 ± 0,01	-33,2 ± 0,6
CAP-SR-NP 1	CAP	2	SR	1	33	798 ± 55	0,25 ± 0,01	-27,3 ± 0,8
CAP-SR-NP 2	CAP	2	SR	2	50	910 ± 41	0,25 ± 0,01	-27,8 ± 0,5
CAP-SR-NP 3	CAP	4	SR	1	20	677 ± 16	0,24 ± 0,01	-37,0 ± 0,1
CAP-SR-NP 4	CAP	4	SR	2	33	768 ± 25	0,21 ± 0,03	-34,4 ± 0,1
CAP-SR-NP 5	CAP	4	SR	4	50	735 ± 17	0,28 ± 0,05	-31,1 ± 0,4
CAP-SB-NP 1	CAP	2	SB	0,5	20	233 ± 4	0,09 ± 0,02	-32,8 ± 0,1
CAP-SB-NP 2	CAP	2	SB	1	33	321 ± 5	0,26 ± 0,01	-32,5 ± 0,4
CAP-SB-NP 3	CAP	2	SB	2	50	308 ± 3	0,24 ± 0,02	-32,7 ± 0,2
CAP-SB-NP 4	CAP	4	SB	1	20	437 ± 6	0,26 ± 0,02	-38,7 ± 0,1
CAP-SB-NP 5	CAP	4	SB	2	33	355 ± 2	0,20 ± 0,03	-37,8 ± 0,4
CAP-SB-NP 6	CAP	4	SB	4	50	445 ± 5	0,26 ± 0,03	-38,8 ± 0,4

^a Massenkonzentration des Polymers (β_{Polymer}) und des Farbstoffs ($\beta_{\text{Farbstoff}}$) in einer Lösung in *N,N*-Dimethylacetamid vor der Dialyse.

^b Massenanteil des Farbstoffs ($w_{\text{Farbstoff}}$), bezogen auf den Gesamtfeststoffgehalt.

^c Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d), Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotenzial (ζ) der Nanopartikel, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung.

durchschnittlichen Durchmesser, der mit steigender Farbstoffkonzentration (0,5 bis 2 mg ml^{-1}) stetig von 329 bis 620 nm anstieg. Dieser war verglichen mit unbela-
denen **CA-NP 1** (281 nm) deutlich erhöht. Noch größere Durchmesser von 624 bis 762 nm wiesen die bei höherer Polymerkonzentration (4 mg ml^{-1}) hergestellten Komposit-NP (**CA-SR-NP 4**, **CA-SR-NP 5** und **CA-SR-NP 6**) auf. Komposit-NP aus CAP und SR zeigten einen ähnlichen Trend der Partikelgröße. Durch den Einschluss von SR vergrößerten sich die Durchmesser von etwa 300 nm (**CAP-NP 1** und **CAP-NP 2**) zu ungefähr 700 bis 900 nm. Anscheinend wirkt sich SR störend auf die Selbstanordnung der Celluloseester in gleichmäßige NP aus. Die Verbreiterung der Größenverteilung stützt diese Annahme. Der PDI stieg von etwa 0,13 für NP aus Celluloseester (CA und CAP) zu 0,14 bis 0,37 für CA-SR-NP und 0,21 bis 0,28 für CAP-SR-NP. Das Zetapotenzial für CA-NP mit eingelagertem SR blieb unverändert bei ungefähr -30 mV . Hingegen sank der Zetapotenzialbetrag der CAP-NP durch Einschluss von SR etwas ab. Die Ursache könnte eine veränderte Selbstanordnung des CAP sein, wodurch weniger Carboxygruppen auf der Oberfläche des NP vorhanden sind. Obwohl sich die Effekte von AA (Maskierung) und SR (veränderte Selbstanordnung) unterscheiden, üben sie eine ähnliche Wirkung auf das Zetapotenzial aus.

Bei einem Vergleich der Celluloseester fällt auf, dass sich NP aus CA und CAP beim Einschluss von AA oder SR ähnlich verhalten. Eine Ausnahme bildete dabei das Zetapotenzial, das für Komposit-NP aus CA relativ konstant bei ca. -30 mV blieb und sich für Komposit-NP aus CAP ungefähr um 5 mV erhöhte, abhängig von der Polymerkonzentration und zugesetzten Farbstoffmenge (**CAP-NP 1** mit -34 mV auf ca. -28 mV und **CAP-NP 2** mit -40 mV auf ca. -34 mV). Aus diesem Grund üben die negativ geladenen Carboxygruppen nur wenig Einfluss auf den Einschluss von AA und SR in Komposit-NP aus. Der größte Unterschied wird vermutlich durch die Hydrophobie der Farbstoffe verursacht. Die Hydrophobie kann quantitativ durch den Verteilungskoeffizienten einer Substanz zwischen *n*-Octanol/Wasser ($\log P$) ausgedrückt werden.^[120] Die Bildung von NP durch Lösungsmittelverdrängung kann wie erwähnt mit zwei Mechanismen der Nukleation und Wachstum sowie der Nukleation und Aggregation beschrieben werden.^[39,42] Beide Vorgänge hängen von den Affinitäten des Celluloseesters und des Farbstoffs gegenüber den hydrophoben Nuklei ab. Da der Farbstoff SR stark hydrophob ($\log P_{\text{SR}} = 8,72$) ist, aggregiert er in seiner Lösung bereits durch Zusatz kleinster Mengen Wasser. Die Partikelbildung ausgehend von diesen Aggregaten würde größere und uneinheitliche Partikel hervorbringen. Diese Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, dass sich Komposit-NP mit SR sehr schnell ($\approx 5 \text{ min}$) bildeten. Somit verlief die Selbstanordnung weniger kontrolliert als bei der Bildung von CA- und CAP-NP sowie Komposit-NP aus AA ($\approx 15 \text{ min}$). Jedoch konnte nicht geklärt werden, ob in einer gemeinsamen Lösung SR vor oder während der Selbstanordnung des Celluloseesters aggregierte. Im Gegensatz dazu ist der Farbstoff AA weniger hydrophob ($\log P_{\text{AA}} = 3,31$) und scheint den Celluloseestern in Löslichkeit und Aggregation eher zu ähneln. Aus diesem Grund beeinflusste

AA die Selbstanordnung von CA und CAP zu Partikeln nur wenig und unbeladene NP aus Celluloseestern zeigten vergleichbare Partikeleigenschaften wie Komposit-NP aus AA.

Beide Celluloseester wiesen deutliche Unterschiede beim Einschluss von SB auf. Für beide Polymerkonzentrationen (2 und 4 mg ml⁻¹) vergrößerte sich der durchschnittliche Durchmesser von CA-NP mit eingelagertem SB drastisch auf > 1 µm, während sie breite Verteilungen mit PDI > 0,20 aufwiesen. Nur **CA-SB-NP 1** ($\beta_{CA} = 2 \text{ mg ml}^{-1}$, $\beta_{SB} = 0,5 \text{ mg ml}^{-1}$) formte noch NP mit 583 nm. Ein ähnlicher, wenn auch nicht so stark ausgeprägter Trend wurde bereits für Komposit-NP mit SR gefunden, der mit der hohen Hydrophobie der beiden Farbstoffe ($\log P_{SR} = 8,72$, $\log P_{SB} = 8,81$) erklärt werden kann. Wie zuvor änderte sich das Zetapotenzial der CA-SB-NP kaum im Vergleich mit ungefärbten CA-NP bei gleichen Polymerkonzentrationen ($\approx -27 \text{ mV}$ bei 2 mg ml⁻¹, $\approx -30 \text{ mV}$ bei 4 mg ml⁻¹).

Es wurde überraschenderweise festgestellt, dass sich Komposit-NP aus CAP und SB nicht wesentlich vergrößerten. Bei niedriger Polymerkonzentration (2 mg ml⁻¹) wurden CAP-SB-NP mit durchschnittlichen Durchmessern von 230 bis 320 nm und Zetapotenzialen von -33 mV erhalten, das den Werten für unbeladene **CAP-NP 1** (293 nm, -34 mV) entsprach. Auch eine höhere Polymerkonzentration (4 mg ml⁻¹) ergab CAP-SB-NP, die den ungefärbten **CAP-NP 2** sehr ähnlich waren. Unabhängig von der Konzentration des SB wiesen die Komposit-NP einen durchschnittlichen Durchmesser von 350 bis 450 nm und ein Zetapotenzial von $\approx -39 \text{ mV}$ auf. Da der Farbstoff SB ähnlich stark hydrophob ($\log P_{SB} = 8,81$) wie SR ist, beeinflusst er maßgeblich die Selbstanordnung von CA während der Dialyse. Jedoch besitzt SB im Gegensatz zu SR sekundäre Aminogruppen, die durch Wasserstoffbrücken mit Carboxygruppen des CAP interagieren können. Auf diese Weise wird die Auswirkung der starken Hydrophobie im Fall der Partikelbildung von CAP zum Teil kompensiert.

Die spektroskopischen Eigenschaften der farbstoffbeladenen Komposit-NP sind entscheidende Parameter für deren spätere Anwendung im LFA, weil sie die optische Detektion des Konjugats aus AK und Komposit-NP bestimmen (siehe Abschnitt 3.2). Darüber hinaus erlaubt die UV/Vis-Spektroskopie einen Einblick in die Art des Einschlusses des hydrophoben Farbstoffs in die Celluloseestermatrix. Dabei hängen die spektroskopischen Eigenschaften des Komposit-NP von der Wechselwirkung des eingelagerten Farbstoffs mit seiner Umgebung ab. Das Chromophor kann mit sich selbst (Farbstoff-Farbstoff), mit dem Celluloseester (Farbstoff-Matrix) und mit der umgebenden wässrigen Phase (Farbstoff-Wasser) wechselwirken. Die einzelnen Effekte wurden durch verschiedene Experimente getrennt untersucht. Die Komposit-NP, welche SB enthalten, wurden als Markierung mit dem größten Potenzial für Anwendungen im LFA eingeschätzt, weil SB den höchsten Extinktionskoeffizienten unter den verwendeten Farbstoffen besitzt. Daher wurden CAP-SB-NP für eine eingehende Untersuchung mittels UV/Vis-Spektroskopie ausgewählt.

Es wurden UV/Vis-Spektren von SB in DMA/Wasser-Mischungen mit variie-

rendem Verhältnis (φ_{DMA} von 100 bis 10 %) bei konstanter Farbstoffkonzentration ($2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$) aufgenommen (Abbildung 13a). Die Absorption nahm mit steigendem Volumenanteil des Wassers ab, während die Wellenlänge des Absorptionsmaximums hypsochrom verschoben wurde. Die Extrapolation zu 100 % Wasser ergab $\lambda_{\text{max}} = 580 \text{ nm}$ im Vergleich zu 628 nm in reinem DMA (Abbildung 13b). Die hypsochrome Verschiebung wird durch die zunehmende Fähigkeit des Lösungsmittelgemischs ausgelöst, Wasserstoffbrücken zu bilden. DMA (schlechter Wasserstoffbrückendonator) wurde allmählich durch Wasser (guter Wasserstoffbrückendonator) ausgetauscht. Durch zunehmende Wechselwirkung des Farbstoffs mit dem Lösungsmittelgemisch über Wasserstoffbrücken wird sein Grundzustand stärker stabilisiert, was zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu niedrigeren Wellenlängen führt. Diese Schlussfolgerung wird von der Literatur gestützt, in der SB in verschiedenen Alkoholen gelöst und eine zunehmende hypsochrome Verschiebung des Absorptionsmaximums mit steigender Acidität des Lösungsmittels beobachtet wurde.^[121] Das geschätzte Absorptionsmaximum in Wasser (580 nm) ist etwas weiter verschoben als das für Methanol (589 nm) berichtete. Erwartungsgemäß stellt Wasser einen noch stärkeren Wasserstoffbrückendonator dar und die hypsochrome Verschiebung nimmt folglich zu.

Die optischen Eigenschaften des Farbstoffs SB werden in Lösung hauptsächlich durch Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel (im Speziellen Wasser) beeinflusst. Um SB unabhängig von seiner Umgebung zu charakterisieren, wurden UV/Vis-Spektren des Farbstoffs in seiner festen Form mithilfe einer Integrationskugel aufgenommen (Abbildung 14c). Das Absorptionsmaximum von SB als Festkörpermateriale lag bei 600 nm und somit zwischen den Absorptionsmaxima in Wasser (580 nm) und

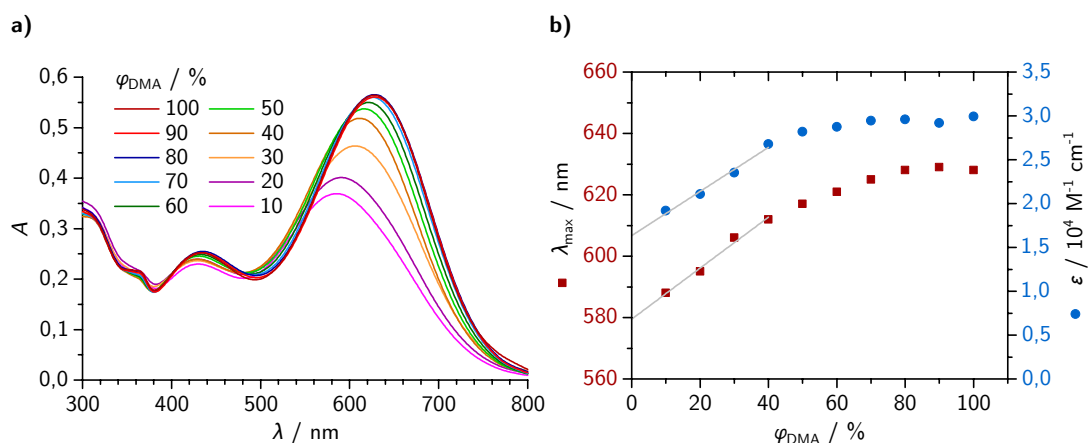


Abbildung 13. a) UV/Vis-Spektren sowie b) Verlauf der Absorptionsmaxima (λ_{max}) und der Extinktionskoeffizienten (ε) von Sudanschwarz B, gelöst in Mischungen von *N,N*-Dimethylacetamid (DMA) und Wasser mit variierendem Volumenanteil von DMA (φ_{DMA}).

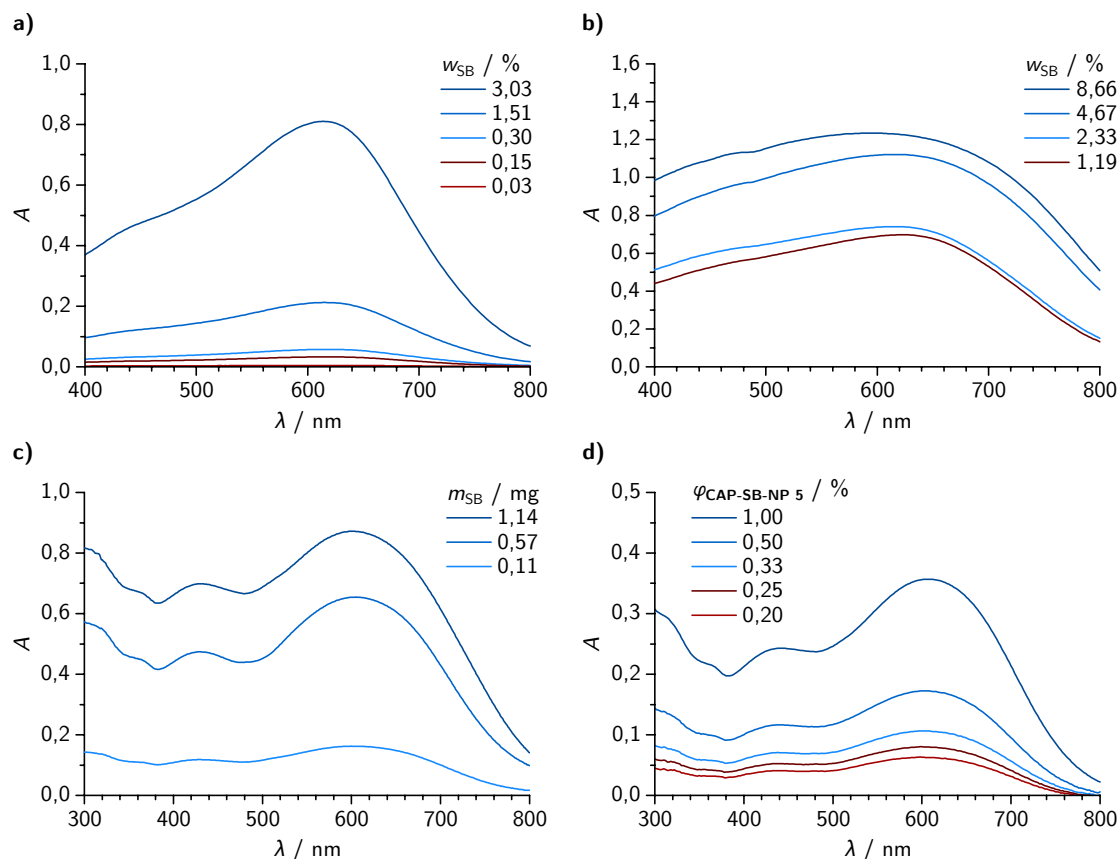


Abbildung 14. UV/Vis-Spektren: Farbstoff Sudanschwarz B (SB), eingelagert in Celluloseacetatphthalatfolien mit verschiedenen Massenanteilen (w_{SB}). Die Folien wurden mittels Rakel **a)** aus einer Lösung in Aceton gezogen und luftgetrocknet sowie **b)** aus einer Lösung in *N,N*-Dimethylacetamid gezogen und in Wasser koaguliert. **c)** SB als Feststoff mit verschiedenen absoluten Massen (m_{SB}) in der Messzelle. **d)** SB, eingelagert in Kompositnanopartikeln **CAP-SB-NP 5**, die auf verschiedene Volumenanteile ($\varphi_{CAP-SB-NP 5}$) verdünnt wurden.

DMA (627 nm). Die relativ bathochrom verschobene Absorption von festem SB kann mit der engen Anordnung der Farbstoffmoleküle im Festkörper erklärt werden.^[122]

Die Wechselwirkung des Farbstoffs SB mit der Matrix aus CAP wurde zunächst an Kompositfilmen untersucht. Beide Komponenten wurden gemeinsam in Aceton gelöst, die Lösung mittels Rakel als Film gezogen und das Lösungsmittel verdunstet. Die transparenten Filme wurden mithilfe von UV/Vis-Spektroskopie im Transmissionsverfahren untersucht (Abbildung 14a). Da die Farbstoffmoleküle in der unbeweglichen Matrix aus CAP fixiert sind, ist die spektrale Auflösung der Absorptionskurve geringer und das Absorptionsmaximum bei 615 nm breiter im Vergleich zu der Messung in Lösung. Die Absorption nahm erwartungsgemäß mit sinkendem

Farbstoffgehalt ab. Das zweite lokale Absorptionsmaximum bei 430 nm wurde nur als leichte Schulter bei hohem Farbstoffgehalt beobachtet. Es wurden zusätzlich Filme hergestellt, indem sie aus einer gemeinsamen Lösung von SB und CAP in DMA mittels Rakel gezogen wurden. Die Filme wurden anschließend durch Eintauchen in ein Wasserbad koaguliert. Dieses Verfahren entspricht der Selbstanordnung von SB und CAP zu Komposit-NP, weil es den Übergang vom gelösten zum festen Zustand durch Wechsel des DMA (Lösungsmittel) gegen Wasser (Fällungsmittel) simuliert. Im Gegensatz zu den vorherigen Filmen waren die durch Koagulation erhaltenen Filme opak. CAP bildet während seiner langsamen Selbstanordnung Polymerknäuel innerhalb des Films, die das Licht streuen und den optischen Effekt verursachen. Aus diesem Grund wurden die UV/Vis-Spektren der Filme nicht im Transmissions-, sondern im Absorptionsverfahren mithilfe einer Integrationssphäre aufgenommen (Abbildung 14b). Dies erklärt die geringere Auflösung der gemessenen Kurven. Das Absorptionsmaximum konnte bei 620 nm bestimmt werden, das dem Wert der transparenten Filme ungefähr entsprach. In einem Vergleich weist das Absorptionsmaximum von SB in CAP-Filmen (615 und 620 nm) eine bathochrome Verschiebung um 15 bis 20 nm gegenüber dem festen Farbstoff (600 nm) auf. Die Wechselwirkung des Farbstoffs mit der umgebenden CAP-Matrix ist dafür verantwortlich. Diese ähnelt der Wechselwirkung des gelösten SB mit DMA, da die Absorption der Lösung ebenfalls bathochrom verschoben ist ($\lambda_{\max} = 627 \text{ nm}$). Somit kann der Schluss gezogen werden, dass die PS-Matrix ähnlich stabilisierend auf den angeregten Zustand des Farbstoffs wirkt. Für Filme mit einem hohen Farbstoffgehalt (8,66 %) fiel die bathochrome Verschiebung geringer aus. Damit kann auf eine Abnahme der Wechselwirkung Farbstoff-Matrix bei gleichzeitiger Zunahme der Wechselwirkung Farbstoff-Farbstoff geschlossen werden.

Schließlich wurde die Partikelsuspension **CAP-SB-NP 5** direkt mittels UV/Vis-Spektroskopie untersucht. Dafür wurde die Suspension nach ihrer Herstellung durch Dialyse auf verschiedene Volumenanteile verdünnt und im Absorptionsverfahren mithilfe einer Integrationssphäre gemessen (Abbildung 14d). Die aufgenommenen Spektren ähneln den Kurven, die für den festen Farbstoff aufgenommen wurden. In beiden Fällen wurde ein Absorptionsmaximum bei ungefähr 600 nm gefunden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die spektroskopischen Eigenschaften der Komposit-NP vorwiegend durch die Wechselwirkung Farbstoff-Farbstoff bestimmt werden. Die Wechselwirkungen des Farbstoffs mit der Matrix oder Wasser an der Partikeloberfläche scheinen vernachlässigbar. Anhand der Ergebnisse kann die Vermutung aufgestellt werden, dass SB im Kern der Komposit-NP eingelagert ist und CAP die äußere Schicht statt einer kontinuierlich homogenen Matrix bildet. Diese Annahme wird zudem vom Zetapotenzial der CAP-NP und CAP-SB-NP gestützt, das ungefähr gleich ausfiel. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse der Kryo-TEM, die keine klare Phasentrennung innerhalb des Komposit-NP zeigten (Abbildung 11b). Statt einer definierten *Core-Shell*-Struktur kann somit auf eine graduelle Verteilung beider Komponenten entlang der Querschnittsebene geschlossen werden. Der Ge-

halt des Farbstoffs in der festen Mischphase nimmt also zum Partikelkern hin zu, während CAP vorrangig an der Partikeloberfläche lokalisiert ist.

5.1.2. Eintropfverfahren

Alternativ zur Dialyse wurden Komposit-NP aus CAP und SB mittels der Eintropfmethode hergestellt. Durch Vergleich beider Herstellungsverfahren sollten die leistungsfähigsten Komposit-NP für die spätere Anwendung im LFA bestimmt werden. Während bei der Dialyse nur intrinsische Parameter (Konzentration der Bestandteile, Solvatisierungsfähigkeit des Lösungsmittels, Balance von Hydrophilie und Hydrophobie des Polymers) variiert werden können, lassen sich beim Eintropfen zusätzlich externe Faktoren (Injektionsrate, Rührgeschwindigkeit, Verhältnis beider Phasen, Zugaberichtung) einstellen. Von besonderem Interesse war es zu untersuchen, ob mittels Eintropfmethode kleinere Komposit-NP mit engerer Größenverteilung erreicht werden können.

Vor der Herstellung der Komposit-NP durch Eintropfen wurde das Verhalten der Celluloseester CA und CAP sowie der Farbstoffe AA, SR und SB in Aceton/Wasser-Mischungen untersucht. Dafür wurde die jeweilige Substanz einzeln in Aceton gelöst und die Trübung bei Zugabe verschiedener Volumenanteile von Wasser gemessen (Abbildung 15). Der plötzlich einsetzende Anstieg der Trübung zeigt das Ausscheiden der Substanz aus der gelösten in die feste Phase, d. h., er repräsentiert den Punkt beim Durchschreiten der Binodalen im ternären Phasendiagramm (siehe Abschnitt 2.1). Die Celluloseester begannen beide bei einem Wasseranteil von ca. 40 % NP zu bilden. SR aggregierte schon bei einem deutlich geringeren Wasseranteil von 23 %,

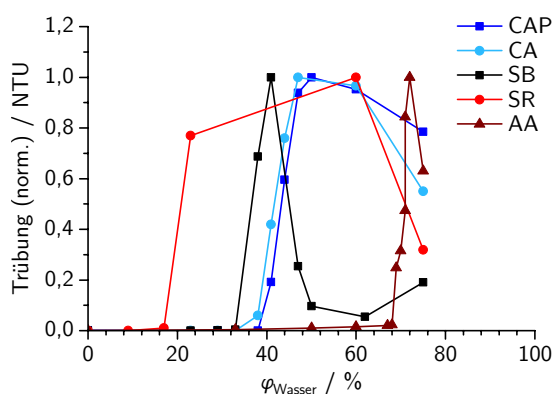


Abbildung 15. Gemessene Trübung von Celluloseacetat (CA), Celluloseacetatphthalat (CAP), 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) und Sudanschwarz B (SB) in Abhängigkeit vom Volumenanteil des Wassers (φ_{Wasser}) in einer Mischung mit Aceton. Die Symbole repräsentieren Messwerte, die Linien dazwischen dienen nur der Verbindung. *Nephelometric Turbidity Units* (NTU).

das mit der beobachteten Zeit (≈ 5 min) bis zur einsetzenden Trübung während der Dialyse im vorigen Abschnitt 5.1.1 korreliert. Die Ergebnisse der Trübungsmessung unterstützen die Annahme einer unkontrollierten Selbstanordnung der Komposit-NP mit SR. Es konnte bei der Dialyse nicht festgestellt werden, ob SR vor oder während der Selbstanordnung des Celluloseesters aggregierte. Nun liegt nahe, dass SR zuerst Nuklei bildet, an die sich das Polymer anlagert, was zur Bildung sehr großer Partikel mit breiter Größenverteilung führt. Im Gegensatz dazu fiel AA erst bei einem Wassergehalt von ca. 70 % aus. So lässt sich der geringe Einfluss von AA auf die Bildung der Komposit-NP erklären, der bereits im vorigen Abschnitt diskutiert wurde. AA lagert sich vermutlich im Verlauf der Selbstanordnung an die bereits gebildeten Polymernuklei an. Überraschenderweise aggregierte SB bei einem Wassergehalt von 38 % und ähnelte den Celluloseestern. Der Farbstoff sollte die Selbstanordnung der Celluloseester somit nicht stören, das im Fall von CAP auch bestätigt wurde. Wie zuvor erwähnt, ist dafür vermutlich die Wechselwirkung sekundärer Aminogruppen des SB mit Carboxygruppen des CAP verantwortlich. Solche strukturellen Einflüsse lassen sich jedoch mittels Trübungsmessung nicht erfassen, da diese Methode nur das reine Löslichkeitsverhalten untersucht.

Für die Einlagerung in CAP-NP mittels Eintropfen wurde SB ausgewählt. Zum einen besitzt SB den höchsten Extinktionskoeffizienten, wie bereits im vorigen Abschnitt der UV/Vis-Charakterisierung gezeigt. Es erlaubt die tiefste Färbung der Komposit-NP, die damit die potenziell stärkste Markierung für den LFA darstellen. Zum anderen weist SB Wechselwirkungen mit der CAP-Matrix auf, die den Einschluss begünstigen. Bei der Dialyse in DMA wurden deshalb bereits einheitliche CAP-SB-NP ohne Vergrößerung des Durchmessers generiert.

In folgenden Experimenten wurden Komposit-NP hergestellt, indem zu einer gemeinsamen Lösung von CAP und SB in Aceton kontrolliert Wasser getropft wurde (Tabelle 5). Anschließend wurden die Suspensionen auf 60 °C erwärmt, bis das Lösungsmittel komplett verdampft war. Der Einfluss externer Faktoren wie Injektionsraten sowie das Volumenverhältnis von Wasser und Polymerlösung wurde dabei untersucht. Die Massenkonzentrationen von CAP (4 mg ml^{-1}) und SB (2 mg ml^{-1}) wurden beibehalten, da sie bereits zur effizienten Gewinnung von **CAP-SB-NP 5** mittels Dialyse führten. Bei einem konstanten Verhältnis von 5 ml Aceton zu 15 ml Wasser wurden bei niedrigen Zutropfraten (5 und $7,5 \text{ ml min}^{-1}$) Komposit-NP um die 330 nm erhalten, die mit einem $\text{PDI} > 0,20$ relativ breit verteilt vorlagen und deren Größe mit **CAP-SB-NP 5** (355 nm) vergleichbar war. Eine Erhöhung der Zutropfrate auf 10 ml min^{-1} erzeugte jedoch kleinere (236 nm) und schmal verteilte ($\text{PDI} \approx 0,10$) Partikel **CAP-SB-NP 9**. Es wird vermutet, dass nukleierte Komposit-NP im Fall der Eintropfmethode weniger ausgeprägt wachsen und aggregieren, da der stabile Zustand des Systems bei abgeschlossener Wasserzugabe schneller erreicht wird. Eine Änderung des Volumenverhältnisses ($1:1$ bis $1:4$; $\text{ml}_{\text{Lösung}}/\text{ml}_{\text{Wasser}}$) bei konstanter Zutropfrate von 10 ml min^{-1} übte weniger Einfluss aus. Die Komposit-NP wiesen durchschnittliche Durchmesser von etwa 210 bis 260 nm und einen PDI von

Tabelle 5. Bedingungen und Ergebnisse der Herstellung wässriger Partikelsuspensionen aus Celluloseacetatphthalat (CAP) mit eingelagertem Farbstoff Sudan-schwarz B (SB) mittels Eintropfmethode.

Nr.	Bedingungen ^a			d^b nm	PDI ^b
	V_{Aceton} ml	V_{Wasser} ml	Zutropfrate ml min ⁻¹		
CAP-SB-NP 7	5	15	5	312 ± 2	0,23 ± 0,01
CAP-SB-NP 8	5	15	7,5	346 ± 9	0,25 ± 0,01
CAP-SB-NP 9	5	15	10	236 ± 1	0,10 ± 0,02
CAP-SB-NP 10	5	5	10	211 ± 5	0,12 ± 0,04
CAP-SB-NP 11	5	10	10	261 ± 4	0,20 ± 0,02
CAP-SB-NP 12	5	20	10	240 ± 2	0,16 ± 0,01
CAP-SB-NP 13	10	10	10	275 ± 8	0,26 ± 0,04
CAP-SB-NP 14	20	20	10	6476 ± 910	0,67 ± 0,07

^a Wasser zu einer Acetonlösung von Celluloseacetatphthalat und Sudanschwarz B getropft mit den Massenkonzentrationen $\beta_{\text{CAP}} = 4 \text{ mg ml}^{-1}$ und $\beta_{\text{SB}} = 2 \text{ mg ml}^{-1}$.

^b Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung.

0,12 bis 0,20 auf. Eine Vergrößerung des Maßstabs ($V_{\text{Aceton}} = 5 \text{ ml}$, $V_{\text{Wasser}} = 5 \text{ ml}$) der Herstellung von **CAP-SB-NP 10** (211 nm, PDI $\approx 0,12$) auf die doppelte Menge ($V_{\text{Aceton}} = 10 \text{ ml}$, $V_{\text{Wasser}} = 10 \text{ ml}$) führte zu breit verteilten und etwas größeren Partikeln **CAP-SB-NP 13** (275 nm, PDI $\approx 0,26$). Bei einer weiteren Verdopplung der Ansatzgröße ($V_{\text{Aceton}} = 20 \text{ ml}$, $V_{\text{Wasser}} = 20 \text{ ml}$) wurden nur noch Aggregate erhalten. Da die Komposit-NP hinsichtlich eines kleinen Durchmessers und enger Größenverteilung optimiert werden sollten, wurden die Bedingungen von **CAP-SB-NP 9** ($V_{\text{Aceton}} = 5 \text{ ml}$, $V_{\text{Wasser}} = 15 \text{ ml}$, 10 ml min^{-1}) für die nächsten Versuche ausgewählt.

Neben verschiedenen Parametern beim Eintropfen wurde in einer weiteren Reihe von Experimenten die Methode untersucht, mit der das Aceton aus der Partikelsuspension entfernt wurde. Dafür wurden Komposit-NP aus CAP und SB parallel unter konstanten Bedingungen hergestellt und jeweils verschiedenen Methoden zur Entfernung des Acetons unterworfen (Tabelle 6, Abbildung 16). Als Vergleichswert wurde direkt nach der Gewinnung von **CAP-SB-NP 15** ohne jegliche Behandlung ein Teil der Suspension mit enthaltenem Aceton für die Messung des durchschnittlichen Durchmessers und PDI mit Wasser verdünnt. Aufgrund der starken Verdünnung (1:100) war der Effekt des Acetons auf die Messung vernachlässigbar. Die Komposit-NP wiesen vor ihrer Aufarbeitung eine Größe von 279 nm und einen PDI von 0,19 auf. Für die in Tabelle 5 gezeigten Partikel wurden die Suspensionen erwärmt, um

Tabelle 6. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP), hergestellt aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und dem Farbstoff Sudan-schwarz B (SB) mittels Eintropfverfahren. Aceton wurde mit verschiedenen Methoden aus der Partikelsuspension entfernt.

Nr.	Bedingungen ^a		d^b nm	PDI ^b
	Entfernung Aceton	T °C		
CAP-SB-NP 15	keine	20	279 ± 3	$0,19 \pm 0,02$
CAP-SB-NP 9	Verdampfen	60	236 ± 1	$0,10 \pm 0,02$
CAP-SB-NP 16	Stickstoffspülung	20	252 ± 1	$0,15 \pm 0,02$
CAP-SB-NP 17	Ultraschall	> 20	325 ± 14	$0,24 \pm 0,01$
CAP-SB-NP 18	Verdampfen bei Unterdruck	60	260 ± 2	$0,20 \pm 0,01$

^a Wasser zu einer Acetonlösung von Celluloseacetatphthalat und Sudanschwarz B getropft mit den Massenkonzentrationen $\beta_{\text{CAP}} = 4 \text{ mg ml}^{-1}$, $\beta_{\text{SB}} = 2 \text{ mg ml}^{-1}$, den Volumina $V_{\text{Aceton}} = 5 \text{ ml}$, $V_{\text{Wasser}} = 15 \text{ ml}$ und der Zutropfrate 10 ml min^{-1} .

^b Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung.

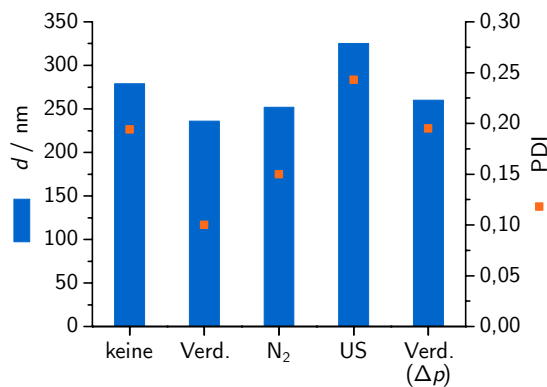


Abbildung 16. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Kompositnanopartikel aus Celluloseacetatphthalat und Sudanschwarz B mittels Eintropfverfahren abhängig von der Methode zur Entfernung des Acetons. Verdampfung (Verd.), Suspension mit Stickstoff gespült (N₂), Ultraschall (US), Verdampfen bei Unterdruck (Verd. (Δp)).

das Aceton zu verdampfen. Dabei kam es unweigerlich zu einer Abscheidung von Feststoff an der inneren Gefäßwand, da der Flüssigkeitsstand allmählich absank. Die Abnahme der Partikelgröße (236 nm) mit einer schmalen Verteilung ($PDI \approx 0,10$) durch das Verdampfen lässt sich so erklären und widerlegt damit die These, dass nukleierte Komposit-NP im Fall der Eintropfmethode weniger ausgeprägt wachsen und aggregieren. Einen ähnlichen Effekt rief die Austreibung des Acetons durch einen Stickstoffstrom hervor. Durch die Behandlung der Suspension mit Ultraschall kam es zur Erwärmung der Probe, während eine Aggregation verhindert werden sollte. Jedoch nahmen Durchmesser (325 nm) und die Breite der Verteilung ($PDI \approx 0,24$) sogar zu. Schließlich wurde das Aceton durch Verdampfen bei Unterdruck und Rotieren der Probe entfernt. Die ständige Bewegung des Gefäßes verhindert eine Abscheidung von Feststoff weitgehend und erhielt die Eigenschaften der Komposit-NP (**CAP-SB-NP 18**, 260 nm, $PDI \approx 0,20$). Damit wird das Verdampfen des Acetons bei Unterdruck als geeignetste Methode bewertet. Im Vergleich zur Dialyse (**CAP-SB-NP 5**, 355 nm, $PDI \approx 0,20$) konnten mittels optimierten Eintropfverfahrens kleinere Komposit-NP mit ähnlicher Größenverteilung gewonnen werden.

5.2. Kopplung von Kompositnanopartikeln mit Antikörpern

Die mit Farbstoff beladenen Komposit-NP aus CAP tragen an der Partikeloberfläche Carboxygruppen, die zur adsorptiven oder kovalenten Bindung von funktionellen Molekülen wie AK genutzt werden können. Die aus der Dialyse gewonnenen Komposit-NP **CAP-AA-NP 3**, **CAP-SR-NP 4** und **CAP-SB-NP 5** wurden für systematische Untersuchungen ausgewählt, da sie bei hohen Feststoffkonzentrationen ($\beta_{\text{Polymer}} = 4 \text{ mg ml}^{-1}$, $\beta_{\text{Farbstoff}} = 2 \text{ mg ml}^{-1}$) vergleichsweise kleine Durchmesser aufwiesen. Die Komposit-NP wurden mit anti-hCRP AK funktionalisiert, die den Analyten humanes C-reaktives Protein (hCRP) spezifisch binden.

Die Adsorption des anti-hCRP AK an die Komposit-NP wurde im wässrigen Medium durchgeführt, indem die Partikel nach dem Zentrifugieren in Phosphatpuffer (PB, *Phosphate Buffer*, pH = 7,3) aufgenommen und mit AK behandelt wurden. Überschüssige Carboxygruppen wurden danach mit bovinem Serumalbumin (BSA) geblockt, um bei der späteren Anwendung der Konjugate im LFA unspezifische Wechselwirkungen zu verhindern. Durch Adsorption des AK wurden die Konjugate **CAP-AA-AK-NP 1**, **CAP-SR-AK-NP 1** und **CAP-SB-AK-NP 1** erhalten (Tabelle 7).

Die kovalente Kopplung des anti-hCRP AK mit den Komposit-NP im wässrigen Medium erfolgte in zwei Schritten (Abbildung 17). Zunächst wurden die Carboxygruppen der Komposit-NP mit 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) aktiviert und mit *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (s-

NHS) in aktive s-NHS-Ester umgesetzt. Die Aktivierung fand in einem Puffer von 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) bei pH = 5,5 statt, um einen stabilen s-NHS-Ester zu gewährleisten. Die Hydrolyse des s-NHS-Esters schreitet bei diesem pH-Wert nur langsam voran und ermöglicht Halbwertszeiten im Bereich von Stunden.^[123,124] Anschließend reagierte der s-NHS-Ester mit Aminogruppen des AK und bildete eine stabile Amidbindung. Diese Reaktion wurde in PB bei pH-Werten

Tabelle 7. Konjugate aus Antikörpern (AK) gegen humanes C-reaktives Protein und Kompositnanopartikeln (Komposit-NP), hergestellt durch adsorptive oder kovalente Bindung des AK an Komposit-NP bestehend aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und den Farbstoffen 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) oder Sudanschwarz B (SB).

Komposit-NP	Konjugate	
	adsorptiv	kovalent
CAP-AA-NP 3	CAP-AA-AK-NP 1	CAP-AA-AK-NP 2
CAP-SR-NP 4	CAP-SR-AK-NP 1	CAP-SR-AK-NP 2
CAP-SB-NP 5	CAP-SB-AK-NP 1	CAP-SB-AK-NP 2
CAP-SB-NP 18	-	CAP-SB-AK-NP 3
CAP-SB-NP 18	-	CAP-SB-AK-NP 4

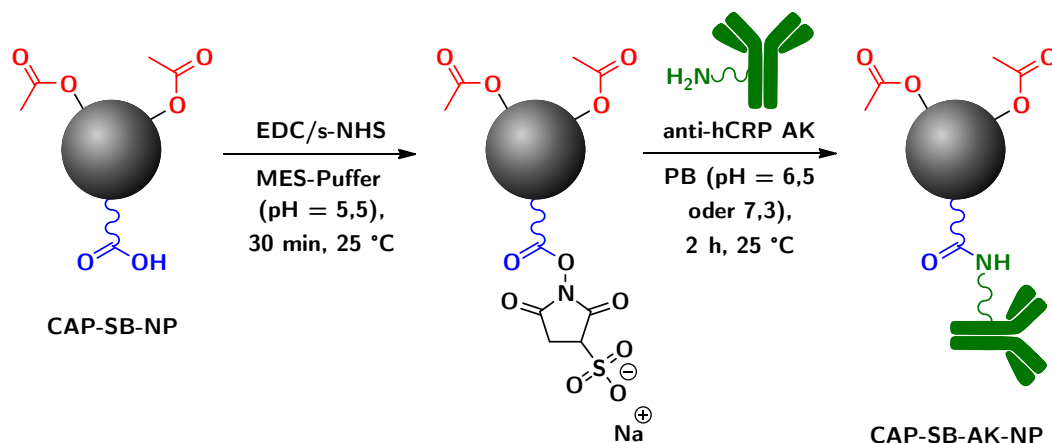


Abbildung 17. Schematische Darstellung der kovalenten Kopplung von Antikörpern gegen humanes C-reaktives Protein (anti-hCRP AK) mit Kompositnanopartikeln (Komposit-NP) aus Celluloseacetatphthalat (CAP), exemplarisch gezeigt mit Sudanschwarz B (SB) gefärbten Partikeln. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC), *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (s-NHS), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) und Phosphatpuffer (PB, *Phosphate Buffer*).

Darüber hinaus wurde der kovalente Kopplungsprozess der per Eintropfen gewonnenen Komposit-NP aus CAP und SB (**CAP-SB-NP 18**) mit anti-hCRP AK eingehender untersucht. Die sphärische Form der Komposit-NP blieb auch nach erfolgter Bindung des AK erhalten (Abbildung 18). Proben der Komposit-NP für die REM-Messung wurden vor und nach der Umsetzung unter vergleichbaren Bedingungen in MES-Puffer verdünnt, um den gleichen Einfluss auf das Zetapotenzial der Partikel zu gewährleisten.

Tabelle 8. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) von Nanopartikeln (NP), hergestellt aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und dem Farbstoff Sudan-schwarz B (SB) mittels Eintropfverfahren während den einzelnen Schritten der Kopplung mit Antikörpern gegen humanes C-reaktives Protein (anti-hCRP AK).

Nr.	Bedingungen		d^a	PDI ^a
	Arbeitsschritt	t min	nm	
CAP-SB-NP 18	Ausgangssuspension ^b	-	260 ± 2	$0,20 \pm 0,01$
CAP-SB-NP 18a	EDC/s-NHS in MES ^c	30	336 ± 1	$0,24 \pm 0,03$
CAP-SB-NP 18b	zentrif./resusp.	5/3	347 ± 5	$0,26 \pm 0,02$
CAP-SB-NP 18c	zentrif./resusp. (2x)	5/3	252 ± 1	$0,07 \pm 0,01$
CAP-SB-NP 18d	anti-hCRP AK in PB/ Ethanolamin ^d	120/ 60	519 ± 16	$0,22 \pm 0,02$
CAP-SB-NP 18e	zentrif./resusp.	10/3	629 ± 2	$0,24 \pm 0,02$
CAP-SB-NP 18f	zentrif./resusp.	20/3	-	-
CAP-SB-AK-NP 3	zentrif./resusp. in BSA/PBS ^e	5/3	463 ± 4	$0,19 \pm 0,01$

^a Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung.

^b Wasser zu einer Acetonlösung von Celluloseacetatphthalat und Sudanschwarz B getropft mit den Massenkonzentrationen $\beta_{\text{CAP}} = 4 \text{ mg ml}^{-1}$, $\beta_{\text{SB}} = 2 \text{ mg ml}^{-1}$, den Volumina $V_{\text{Aceton}} = 5 \text{ ml}$, $V_{\text{Wasser}} = 15 \text{ ml}$, der Zutropfrate 10 ml min^{-1} und der Verdampfung des Acetons bei Unterdruck.

^c 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC, 10 mg ml^{-1} in Wasser), *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (s-NHS, 10 mg ml^{-1} in Wasser), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer, 100 mmol l^{-1} , pH = 5,5).

^d anti-hCRP Antikörper (5 mg ml^{-1} in Wasser), Phosphatpuffer (PB, *Phosphate Buffer*, 300 mmol l^{-1} , pH = 7,3).

^e Bovines Serumalbumin (BSA, 10 %) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, 300 mmol l^{-1} , pH = 7,3).

größe merklich auf 519 nm. Nach mehrfachem Waschen und Resuspendieren wurde das Konjugat **CAP-SB-AK-NP 3** mit 463 nm erhalten (Tabelle 8). Da sie durch wiederholte Behandlung mit Ultraschall nicht weiter zerkleinert werden konnten, handelte es sich um Aggregate. Die Verdoppelung der Partikelgröße lässt sich nur teilweise mit der Bindung der AK an der Oberfläche erklären, da anti-hCRP AK als Vertreter der Immunglobuline G eine ungefähre Größe von 10 nm aufweisen.^[125] Eine hohe mechanische Belastung der Partikel durch lange Zentrifugationszeiten (10 und 20 min), die zum Absetzen nötig waren, könnte eine Ursache für die beobachtete Aggregation sein. Darüber hinaus trägt der Verlust von Sulfonatgruppen bei

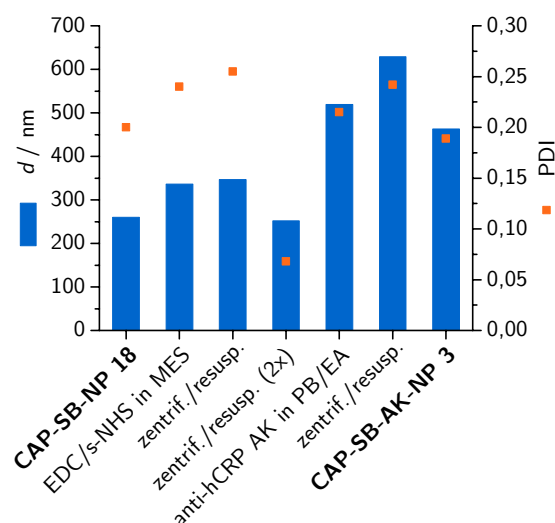


Abbildung 19. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP), hergestellt aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und dem Farbstoff Sudan-schwarz B (SB) mittels Eintropfverfahren (**CAP-SB-NP 18**) während der einzelnen Schritte der Kopplung mit Antikörpern gegen humanes C-reaktives Protein (anti-hCRP AK) bis zum Konjugat (**CAP-SB-AK-NP 3**). 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC), *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (s-NHS), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure (MES), Phosphatpuffer (PB, *Phosphate Buffer*), Ethanolamin (EA).

der Umsetzung der s-NHS-Ester zur Aggregation bei. Die reduzierte elektrostatische Stabilisierung auf der Partikeloberfläche wird von der sterischen Stabilisierung durch gebundene Proteine anscheinend nicht vollständig kompensiert. Hierbei muss ebenfalls die elektrische Ladung des Proteins im wässrigen Medium einbezogen werden (siehe nächsten Absatz), die in Nähe des isoelektrischen Punkts (pI) nicht ausreichend ausgeprägt ist.

Die Effizienz der Anbindung des anti-hCRP AK an die Komposit-NP **CAP-SB-NP 18** wurde näher untersucht, indem die eingesetzte Menge des AK, Reaktionszeiten und pH-Wert systematisch variiert wurden. Die ungebundene Menge des AK wurde mithilfe eines Bradford-Assay im Überstand nach Zentrifugation der Konjugate gemessen und daraus indirekt die gebundene Menge des AK bestimmt (Abbildung 20). Zwei verschiedene Massen von AK (48 und 144 μg) wurden pro 500 μl Partikelsuspension eingesetzt. Unabhängig vom pH-Wert wurde nach 20 h der AK bei einer eingesetzten Masse von 48 μg vollständig gebunden. Bei kürzeren Reaktionszeiten (2 und 6 h) wurde nur ein Teil des AK (30 bis 70 %) im Konjugat gebunden. Für eine höhere eingesetzte Masse von 144 μg bei pH = 6,5 wurde nach 2 h schon etwas mehr als 50 μg AK (40 %) gebunden. Bei gleichem pH-Wert wurde nach 6 h etwa 100 μg AK (70 %) fixiert. Die Kopplung bei pH = 7,3 und kurzen Reaktionszeiten (2

und 6 h) war mit 25 bis 40 % im Vergleich zu pH = 6,5 weniger effizient. Die Erhöhung der Reaktionszeit auf 20 h führte unabhängig vom pH-Wert zu keiner weiteren Fixierung des AK. Die Beladungskapazität der hier vorgestellten Komposit-NP lag bei ca. 100 µg anti-hCRP AK (70 %) pro 500 µl Partikelsuspension. Dieser Wert ist vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Beladungen von 80 %.^[126] Eine etwas größere Menge von 120 µg eingesetzten AK reicht somit aus, um die maximale Beladung der Komposit-NP zu erreichen. Wie bereits erwähnt, ist die Umsetzung des aktiven s-NHS-Esters mit Aminogruppen des AK im wässrigen Medium abhängig vom pH-Wert. Sowohl die Ausbildung der Amidbindung als auch die Hydrolyse des s-NHS-Esters nimmt mit steigendem pH-Wert zu. Abhängig von Substrat und Biomolekül wird deshalb für die Biokonjugation ein pH-Wert von 4,5 bis 9,0 angegeben.^[123,124] In diese Betrachtung muss der pI des anti-hCRP AK bei etwa 5,7 einbezogen werden.^[127] Deswegen übte der pH-Wert des Mediums einen Einfluss auf die Bindungseffizienz der AK an die Komposit-NP aus. Die hier gezeigten Ergebnisse ergaben einen optimalen pH-Wert von 6,5. Dieser pH-Wert liegt näher am pI des anti-hCRP AK bei etwa 5,7, was die höhere Bindungseffizienz erklärt. Es konnte beobachtet werden, dass in der Nähe des pI eines Immunglobulins die maximale Beladung von Polystyrol-NP mit dem Protein erreicht wurde.^[128] Die Ursachen liegen zum einen darin, dass bei Abweichung vom pI adsorbierte Proteine aufgrund ihrer Nettoladung eher zu strukturellen Umlagerungen tendieren und mehr Oberfläche pro Molekül einnehmen. Zum anderen stoßen sich adsorbierte Proteine auf einer Oberfläche wegen ihrer Nettoladung elektrostatisch ab. Beide Effekte führen dazu, dass weniger Immunglobuline auf einer Oberfläche adsorbiert werden können,

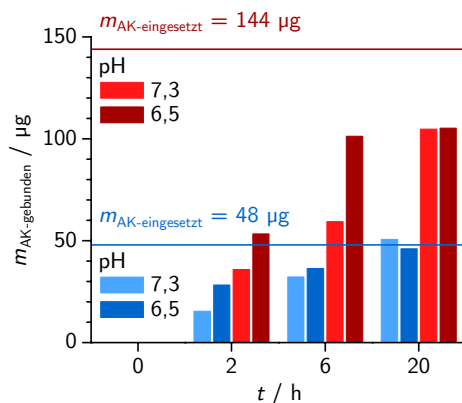


Abbildung 20. Ergebnisse des Bradford-Assay für die Kopplung von Antikörpern gegen humanes C-reaktives Protein mit Nanopartikeln, hergestellt aus Celluloseacetatphthalat (CAP) mit eingelagertem Sudanschwarz B (SB) mittels Eintropfverfahren (CAP-SB-NP 18). Zwei verschiedene Massen des Antikörpers ($m_{\text{AK-eingesetzt}}$) wurden pro 500 µl Partikelsuspension eingesetzt und die Massen des gebundenen Antikörpers ($m_{\text{AK-gebunden}}$) sind abhängig von der Reaktionszeit (t) dargestellt.

je weiter pH-Wert und pI voneinander abweichen. Unter Anwendung der optimierten Bedingungen (pH = 6,5; 6 h; 120 µg AK pro 500 µl NP) wurde durch Kopplung der Komposit-NP **CAP-SB-NP 18** mit anti-hCRP AK das Konjugat **CAP-SB-AK-NP 4** erhalten (Tabelle 7).

5.3. Anwendung von Kompositnanopartikeln im *Lateral Flow Immunoassay*

Die gewonnenen Konjugate bestehend aus anti-hCRP AK und gefärbten Komposit-NP (Tabelle 7) wurden hinsichtlich ihres potenziellen Nutzens als optische Marker in LFA untersucht. Dafür wurden entsprechend LFA-Teststreifen hergestellt und optimiert (siehe experimenteller Teil). Die verschiedenen antikörpermarkierten, gefärbten Komposit-NP wurden in das Konjugatkissen der Teststreifen eingebracht. Die LFA-Tests wurden durchgeführt, indem die Massenkonzentration des Analyten hCRP in den aufgetragenen Proben von 0 bis 64 ng ml⁻¹ variiert wurde (Abbildung 21). Die Konjugate wurden anhand ihrer Nachweisgrenze im LFA verglichen. Dabei wird hier die visuelle Nachweisgrenze als minimale Menge hCRP definiert, die noch eine visuelle Unterscheidbarkeit der gefärbten Testlinie gegenüber dem weißen

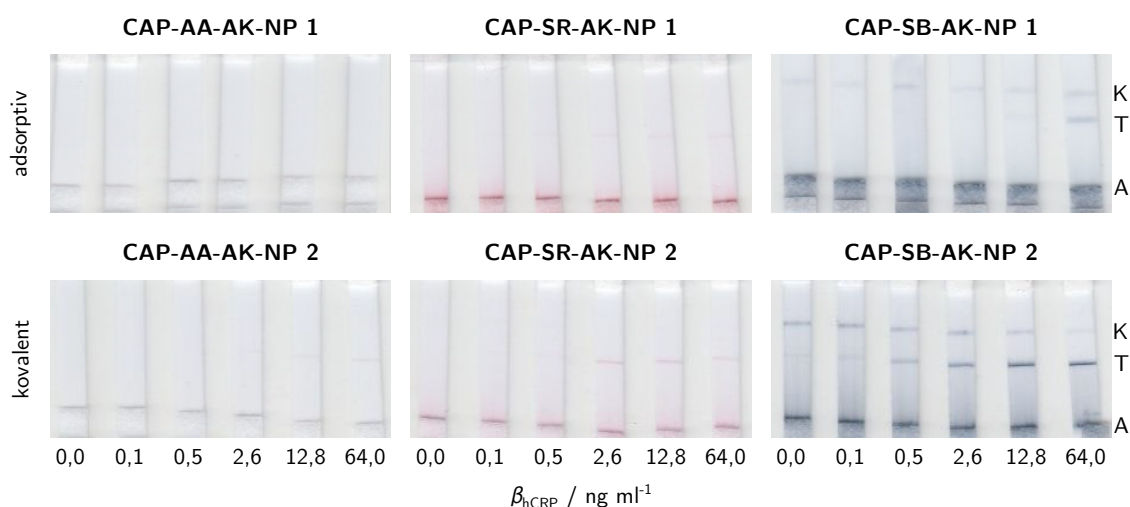


Abbildung 21. *Lateral Flow Immunoassay*-Teststreifen für die Detektion von humanem C-reaktiven Protein (hCRP) bei verschiedenen Massenkonzentrationen (β_{hCRP}) unter Nutzung von Kompositnanopartikeln, die aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und den Farbstoffen 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) sowie Sudanschwartz B (SB) mittels Dialyse hergestellt wurden. Die Nanopartikel (NP) wurden als Marker mit anti-hCRP Antikörpern (AK) adsorptiv bzw. kovalent gekoppelt. Auftragung der Probe (A), Testlinie (T), Kontrolllinie (K).

Hintergrund erlaubt.

Die adsorptiv gekoppelten Konjugate (**CAP-AA-AK-NP 1**, **CAP-SR-AK-NP 1** und **CAP-SB-AK-NP 1**) erzeugten nur schwache Testlinien. Die Teststreifen der Konjugate, die mit AA gefärbt waren, zeigten keine unterscheidbaren Testlinien. hCRP konnte durch SR- und SB-Konjugate lediglich bis zu einer Grenze von $12,8 \text{ ng ml}^{-1}$ visuell erkannt werden. Vermutlich ließen sich nicht genug AK adsorptiv an den Komposit-NP immobilisieren, um eine bessere Leistung im LFA zu erreichen. Im Gegensatz dazu fielen die Testlinien für kovalent gekoppelte Konjugate (**CAP-SR-AK-NP 2** und **CAP-SB-AK-NP 2**) bis auf **CAP-AA-AK-NP 2** intensiver aus. hCRP wurde ähnlich zu den vorherigen LFA-Tests mit AA-Konjugaten bis zu einer Grenze von $12,8 \text{ ng ml}^{-1}$ visuell nachgewiesen. Hier zeigt sich bereits die effektivere kovalente Kopplung der AK an die Partikel. Wegen des relativ geringen Extinktionskoeffizienten von AA konnte die Nachweisgrenze aber nicht weiter gesenkt werden. Die SR-Konjugate ermöglichten einen sensitiveren Nachweis bis $2,6 \text{ ng ml}^{-1}$. Der hohe Extinktionskoeffizient von SR trägt zu einer niedrigeren Nachweisgrenze bei, die trotz des relativ großen Durchmessers der Ausgangspartikel (**CAP-SR-NP 4**, 768 nm) erreicht wurde. Wie in Kapitel 3 erwähnt, ist die Diffusion größerer Partikel (800 nm) durch die Membran eingeschränkt und begrenzt damit die Leistung.^[91] Dazu muss auch die Tendenz der Partikel zur weiteren Vergrößerung während der Kopplung mit AK einbezogen werden, wie bereits in Abschnitt 5.2 beschrieben. Das Konjugat **CAP-SB-AK-NP 2** war der sensitivste Marker, der hCRP bis zu einer visuellen Grenze von $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ detektieren konnte. Die Leistungsfähigkeit des Konjugats basiert auf dem hohen Extinktionskoeffizient von SB verbunden mit der geringen Größe der Ausgangspartikel (**CAP-SB-NP 5**, 355 nm). Die Nachweisgrenze konnte mit den entwickelten Komposit-NP stufenweise herabgesetzt werden.

Im Vergleich mit konventionellen Methoden weist der hier präsentierte Marker eine hohe Empfindlichkeit auf, da übliche Nachweisgrenzen des LFA für Proteine bei etwa 1 ng ml^{-1} liegen.^[6] Beispielsweise erreicht ein LFA für hCRP eine Nachweisgrenze von $0,69 \text{ ng ml}^{-1}$ unter Nutzung von Gold-NP, die sehr häufig in Immunassay verwendet werden.^[129] Die entwickelten Komposit-NP eignen sich somit gut für die Anwendung im LFA. Es wurde jedoch beobachtet, dass sich ein Teil der Konjugate im unteren Bereich der Teststreifen akkumulierte (Abbildung 21). Aus diesem Grund sollten noch kleinere Komposit-NP als Marker untersucht werden.

Das Laufverhalten der SB-Konjugate konnte nochmals verbessert werden, indem noch kleinere Komposit-NP (**CAP-SB-NP 18**, 260 nm) als Basis verwendet und deren Beladung mit AK optimiert wurde. Das auf diese Weise kovalent gekoppelte Konjugat **CAP-SB-AK-NP 4** wies hCRP auch bis zu einer Grenze von $0,1 \text{ ng ml}^{-1}$ nach, ließ jedoch keine Aggregate am unteren Ende der Teststreifen zurück (Abbildung 22).

Die visuelle Bestimmung der Nachweisgrenze stellt die übliche Methode für den LFA dar. In vertiefenden Untersuchungen wurde die Farbintensität der erzeugten

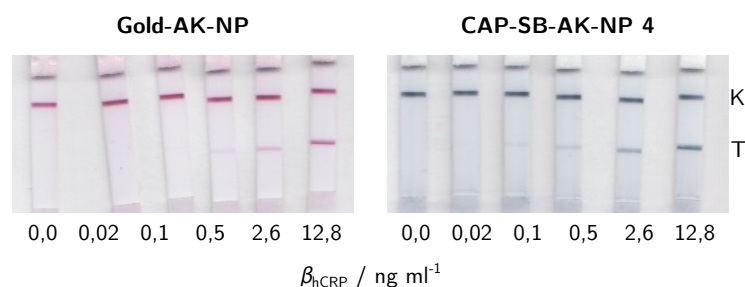


Abbildung 22. *Lateral Flow Immunoassay*-Teststreifen für die Detektion von humanem C-reaktiven Protein (hCRP) unter Nutzung von Gold- und Kompositnanopartikeln, die aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und dem Farbstoff Sudanschwarz B (SB) mittels Eintropfverfahren hergestellt wurden. Die Nanopartikel (NP) wurden als Marker mit anti-hCRP Antikörpern (AK) gekoppelt. Testlinie (T), Kontrolllinie (K).

Testlinien mithilfe eines *Lateral Flow Reader* gemessen, um einerseits eine quantitative Auswertung zu erreichen und andererseits die visuellen Nachweisgrenzen zu verifizieren. Die Kurvenanpassung der durchschnittlichen Signalintensitäten wurde mit einer logistischen Regression durchgeführt (Abbildung 23). Aus diesen Kurven konnten charakteristische Parameter ermittelt werden, die die Leistung des LFA beschreiben (Tabelle 9).

Im Folgenden wird die Messung der Testlinien kovalent gekoppelter Konjugate betrachtet. Die gemessene Nachweisgrenze der AA-Konjugate ($9,7 \text{ ng ml}^{-1}$) entsprach ungefähr der visuellen Bestimmung ($12,8 \text{ ng ml}^{-1}$). Mit SR-Konjugaten wurde die Nachweisgrenze bis $2,2 \text{ ng ml}^{-1}$ verbessert. Die gemessene Nachweisgrenze ließ sich mit SB-Konjugaten nochmals absenken. Beide Konjugate zeigten sehr niedrige gemessene Nachweisgrenzen von $0,15 \text{ ng ml}^{-1}$ (**CAP-SB-AK-NP 2**) und $0,06 \text{ ng ml}^{-1}$ (**CAP-SB-AK-NP 4**). Hier gelang es mittels Messung der Testlinien beide Konjugate zu differenzieren. Die Senkung der Nachweisgrenze um den Faktor 3 demonstriert die bereits erwähnte Optimierung des Konjugats **CAP-SB-AK-NP 4**, das auf kleineren Ausgangspartikeln (**CAP-SB-NP 18**, 260 nm) basiert und dessen Beladung mit AK verbessert wurde. In beiden Fällen korreliert die gemessene Nachweisgrenze gut mit der semiquantitativen visuellen Auslesung. Der starke Kontrast der schwarz gefärbten Konjugate auf dem weißen Hintergrund des Teststreifens trägt zu einer sensitiven optischen Detektion bei, die für schnelle Nachweissysteme notwendig ist. Der dynamische Arbeitsbereich, in dem hCRP mit diesem LFA quantitativ detektiert werden kann, reicht für das SB-Konjugat (**CAP-SB-AK-NP 2**) von $0,15$ bis $9,9 \text{ ng ml}^{-1}$. Das optimierte SB-Konjugat (**CAP-SB-AK-NP 4**) weist einen weiteren Arbeitsbereich von $0,06$ bis $229,0 \text{ ng ml}^{-1}$ auf. Die stufenweise Absenkung der gemessenen Nachweisgrenzen verdeutlicht nochmal den Entwicklungsprozess der Komposit-NP.

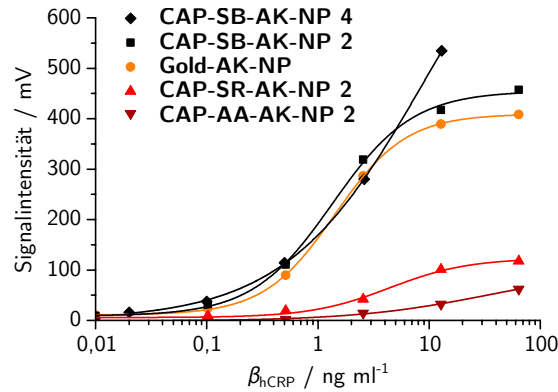


Abbildung 23. Signalintensitäten der Detektion von humanem C-reaktiven Protein bei verschiedenen Massenkonzentrationen (β_{hCRP}) und deren Kurvenanpassung, gemessen durch quantitative optische Auslesung der *Lateral Flow Immunoassay* Teststreifen unter Nutzung von Gold- und Kompositnanopartikeln, die aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und den Farbstoffen 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) sowie Sudanschwarz B (SB) mittels Dialyse bzw. Eintropfen hergestellt wurden. Die Nanopartikel (NP) wurden als Marker mit anti-hCRP Antikörpern (AK) gekoppelt. Die Symbole repräsentieren Messwerte, die Kurven stellen die logistische Regression mit vier Parametern dar.

Tabelle 9. Kenngrößen des *Lateral Flow Immunoassay* für die Detektion von humanem C-reaktiven Protein (hCRP) unter Nutzung von Kompositnanopartikeln, die aus Celluloseacetatphthalat (CAP) und den Farbstoffen 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR) sowie Sudanschwarz B (SB) mittels Dialyse hergestellt wurden. Die Nanopartikel (NP) wurden als Marker mit anti-hCRP Antikörpern (AK) kovalent gekoppelt.

Nr.	gemessene Nachweisgrenze ng ml ⁻¹	dynamischer Arbeitsbereich ng ml ⁻¹	EC ₅₀ ^a ng ml ⁻¹
CAP-AA-AK-NP 2	9,7	9,7 – 638,4	33,5
CAP-SR-AK-NP 2	2,2	2,2 – 76,3	60,8
CAP-SB-AK-NP 2	0,15	0,15 – 9,9	1,4
CAP-SB-AK-NP 4	0,06	0,06 – 229,0	9,4

^a Mittlere effektive Konzentration (EC₅₀).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass Komposit-NP auf der Basis von CAP und hydrophoben Farbstoffen geeignete Marker für eine Anwendung im LFA sind. Sowohl die semiquantitative (visuelle Auslesung) als auch die quantitative (optische Messung) Detektion von Analyten ist mit diesen Komposit-NP vorteilhaft. Beispielsweise befindet sich die klinisch relevante Konzentration von hCRP im Serum bei gesunden Menschen ohne Anzeichen einer Entzündung im Bereich von 0 bis $1\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ und bei Menschen mit geringer Infektion $> 10\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$.^[130] Diese Konzentrationsbereiche können einfach mit den entwickelten Komposit-NP durch Verdünnung der klinischen Proben erfasst werden. Darüber hinaus ist für andere Analyten eine höhere Sensitivität nötig, die schnell und in sehr niedriger Konzentration gemessen werden müssen. Ein Beispiel dafür stellt der Proteinkomplex Troponin I dar, dessen Grenzwert für die Diagnose eines Herzinfarkts bei $0,1\text{ ng ml}^{-1}$ im Serum liegt.^[131] Die Komposit-NP können für die Detektion solcher Analyten neue Wege eröffnen. Optimierte Komposit-NP auf Basis von SB unterschreiten die Nachweisgrenze gegenüber üblichen Gold-NP und sind somit potenziell besser geeignet für Anwendungen mit niedriger Analytkonzentration.

6. Reaktive Nanopartikel aus Aktivestern des Celluloseacetatphthalats*

Aktivester auf der Basis von Carbonsäuren und *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) erzeugen bei der Umsetzung mit Aminen auch in wässrigen Systemen unter milden Reaktionsbedingungen stabile Amidbindungen.^[132] NHS-Ester stellen die am meisten genutzte Verbindungsklasse unter den Aktivestern dar, da sie eine hohe Reaktivität gegenüber Nukleophilen mit einer ausreichenden Stabilität für die Lagerung vereinen. Aus diesem Grund werden NHS-Ester im biomedizinischen Bereich für die Kopplung von Biomolekülen mit Aminogruppen wie Antikörpern, Enzymen oder anderen Proteinen an unterschiedliche Substrate (z. B. Partikel, Filme, Wirkstoffe, Farbstoffe) vermehrt eingesetzt.^[124] Im vorangegangenen Kapitel 5 wurde gezeigt, dass Materialien mit Carboxygruppen *in situ* zu NHS-Aktivestern aktiviert werden können. Jedoch sind insbesondere für kommerzielle Anwendungen aminreaktive Materialien wünschenswert und zum Teil weit verbreitet. Monomere, die aus Aktivester und einer polymerisierbaren Gruppe bestehen, wurden bereits zu synthetischen Polymeren mit reaktiven Seitengruppen umgesetzt.^[133] Auf diese Weise wurden polymere NP hergestellt, die Aktivestergruppen tragen. PS benötigen jedoch den Ansatz der polymeranalogen Derivatisierung, bei der Aktivester in das PS-Rückgrat eingeführt werden. Die Kopplung von Carboxygruppen an PS (z. B. Alginat, Carboxymethylcellulose) mit Aminen über NHS-Ester wurde zwar schon untersucht, aber die entsprechenden NHS-PS-Derivate wurden nicht isoliert.^[134–136]

Es sollten reaktive PS-NP aus aktivierten PS-Derivaten entwickelt werden. Dafür sollte erst ausgehend von CAP eine Synthesestrategie für die Gewinnung von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP) erarbeitet werden. Anschließend sollte die Bildung von reaktiven NP aus den Derivaten und deren Modifikation mit funktionalen Molekülen (z. B. Farbstoffe, Enzyme) eingehend untersucht werden.

*Dieses Kapitel basiert auf der Publikation *Reactive nanoparticles with activated ester moieties from cellulose acetate phthalate derivatives* von Peter Schulze, Martin Gericke und Thomas Heinze, veröffentlicht in *Cellulose* **2019**, 26, 475–490.

6.1. Aktivester des Celluloseacetatphthalats

Der erste Schritt in der Entwicklung reaktiver PS-NP war die Synthese hydrophober PS-Derivate mit aktivierten NHS-Estergruppen. Als Grundlage hierfür wurde CAP genutzt, da es zwei wesentliche Voraussetzungen erfüllt. Zum einen weist der Cellulosemischester einen hohen Gehalt an hydrophoben Acetatgruppen ($DS_{Ac} = 1,98$) auf, die eine Selbstanordnung zu NP ermöglichen. Zum anderen ist ein geringerer Anteil an Carboxygruppen ($DS_{Ph} = 0,69$) vorhanden, die für eine selektive Veresterung mit NHS zugänglich sind.

6.1.1. Synthese und Charakterisierung

Es wurden vier verschiedene Methoden untersucht, um CAP zu NHS-CAP umzusetzen (Abbildung 24, Tabelle 10). Ziel der Synthese war, einen möglichst hohen Anteil der Carboxygruppen des CAP in Aktivester umzuwandeln, d. h. vollständig modifiziertes NHS-CAP mit einer definierten Struktur zu gewinnen. Demnach sollte der durchschnittliche molare Substitutionsgrad der NHS-Ester (MS_{NHS}) dem DS_{Ph} entsprechen. Die verschiedenen Synthesemethoden wurden anhand dieses Kriteriums verglichen.

Die Synthese von PS-Estern wird üblicherweise durch Aktivierung einer Carbonsäure (z. B. mit *N,N'*-Carbonyldiimidazol, Carbodiimiden, Iminiumchlorid oder Tosylchlorid) und der nachfolgenden Reaktion mit Hydroxygruppen am PS-Rückgrat durchgeführt.^[17] Für die Veresterung von CAP mit NHS musste dieser Prozess umgedreht werden. Dafür wurden zwei Vorgehensweisen gewählt: (1) Aktivierung der Carboxygruppen am PS-Rückgrat und Umsetzung mit NHS sowie (2) direkte Umsetzung der Carboxygruppen mit Verbindungen, in denen NHS selbst aktiviert vorliegt. Im ersten Ansatz wurde CAP mit üblichen Reagenzien wie DCC/4-PP sowie Iminiumchlorid aktiviert. Eine Schwierigkeit bestand darin, eine mögliche Vernetzung des aktivierten CAP mit restlichen Hydroxygruppen am PS-Rückgrat zu verhindern. Aus diesem Grund wurde CAP in Gegenwart eines Überschusses an NHS aktiviert und sofort umgesetzt. Im zweiten Ansatz wurde NHS selbst in aktivierter Form wie *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (DSC) sowie *in situ* erzeugtem *N,N'*-Disuccinimidylloxalat (DSO) eingesetzt und direkt an Carboxygruppen des CAP gebunden.

In Ansatz I wurde die Veresterung mithilfe von DCC als aktivierendes Reagenz für Carbonsäuren und 4-PP als Katalysator für die Acylübertragung durchgeführt (Steglich-Veresterung, Abbildung 24b, Tabelle 10). Zuerst reagieren DCC und CAP zum *O*-Acylisoharnstoff am PS-Rückgrat, der in Gegenwart des überschüssigen NHS zum NHS-CAP umgesetzt wird. 4-PP katalysiert die Übertragung der Acylgruppen und verhindert so die langsamere Umlagerung des *O*-Acylisoharnstoffs zum *N*-Acylharnstoff. Es wurde **NHS-CAP 1** mit einem relativ hohen $MS_{NHS} = 0,59$ erhalten, das einer Umsetzung von ungefähr 85 % der vorhandenen Carboxygruppen entsprach. Die Aktivierung mit DCC wird häufig für die Darstellung von PS-Estern

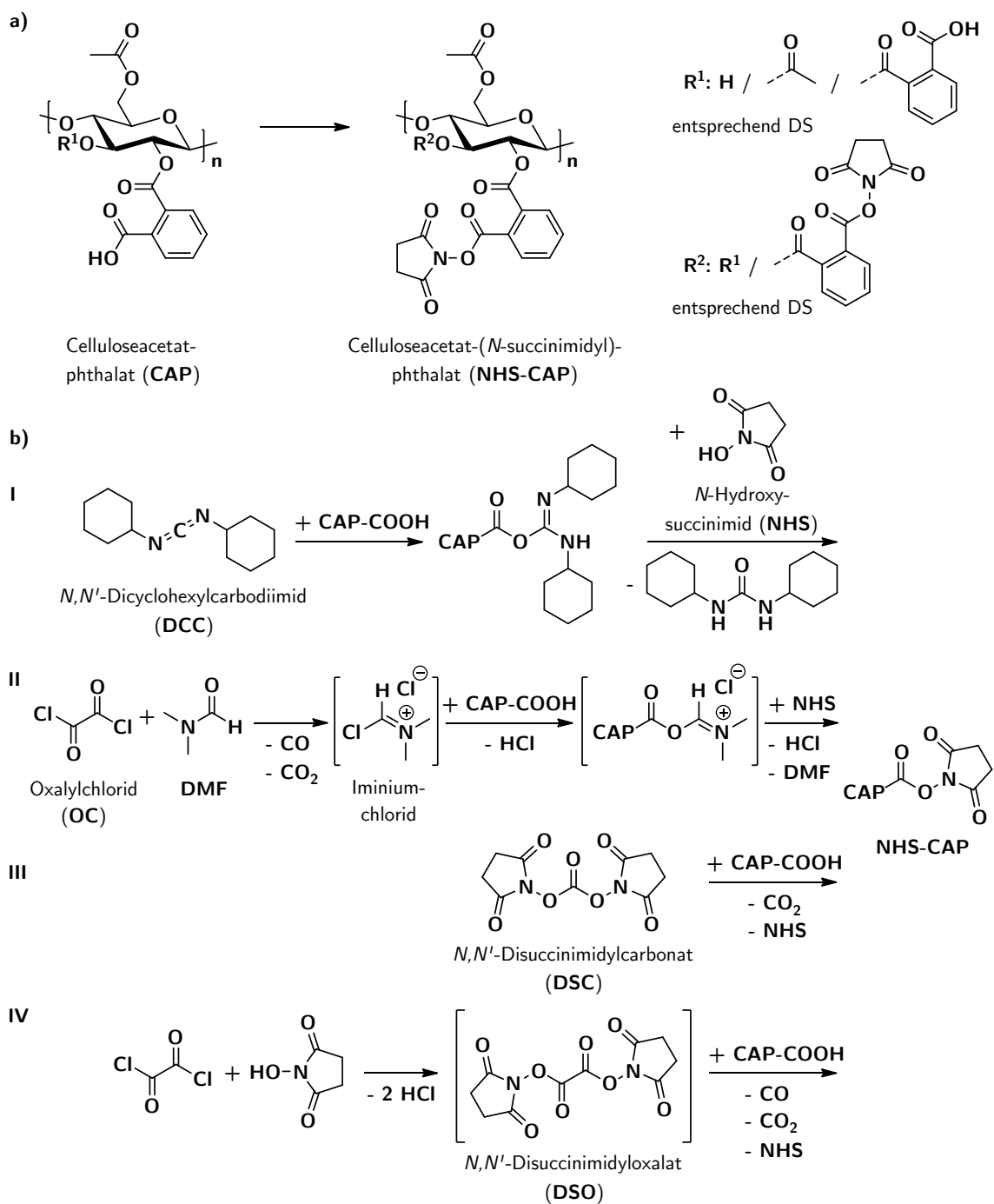


Abbildung 24. a) Reaktionsschema und **b)** Synthesewege zur Gewinnung von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP).

Tabelle 10. Bedingungen und Resultate der Synthese von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP).

Nr.	Reaktionsbedingungen			MS _{NHS} ^a	Cl ^b
NHS-CAP	Reagenz (RG) ^c	molares Verhältnis ^d COOH:RG:NHS:Py	<i>T</i> °C		%
1	DCC	1:1:10:0 ^e	20	0,59	-
2	Iminiumchlorid	1:5:10:0	20	0,38	0,53
3	Iminiumchlorid	1:5:10:0	60	0,66	1,26
4	DSC	1:1:0:1	20	-	-
5	DSC	1:3:0:3	20	0,14	-
6	DSC	1:3:0:3	60	0,50	-
7	DSC	1:5:0:5	60	0,75	-
8	DSO	1:7:0:29	20	0,49 ^f	-
9	DSO	1:7:0:29	60	0,67 ^f	-

^a Durchschnittlicher molarer Substitutionsgrad der Succinimidylgruppen (MS_{NHS}).^b Chlorgehalt in %.^c *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Iminiumchlorid (*in situ* generiert durch 5 Äquiv. Oxalylchlorid und Überschuss *N,N*-Dimethylformamid), *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (DSC), *N,N'*-Disuccinimidylloxalat (DSO), *in situ* generiert durch 7 Äquiv. Oxalylchlorid und 14 Äquiv. *N*-Hydroxysuccinimid.^d molares Verhältnis von Carboxygruppen (COOH) : Reagenz (RG) : *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) : Pyridin (Py).^e Unter Zusatz von 0,02 Äquiv. 4-(1-Pyrrolidinyl)pyridin pro Carboxygruppe.^f Produkte enthalten Alkylcarbonatgruppen neben (*N*-succinimidyl)phthalatgruppen.

genutzt.^[17,99] Angesichts der angestrebten biomedizinischen Anwendung ist jedoch die Toxizität des eingesetzten DCC kritisch zu betrachten. Zudem ist der als Nebenprodukt gebildete *N,N'*-Dicyclohexylharnstoff schwer abzutrennen.

Die Veresterung von CAP wurde mit Iminiumchlorid durchgeführt, um die Nachteile der Aktivierung mit DCC zu umgehen (Ansatz II in Abbildung 24b, Tabelle 10).^[17,104] Dafür wurden CAP und NHS gemeinsam in DMF vorgelegt und OC langsam bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zugetropft. Das *in situ* erzeugte Iminiumchlorid reagiert somit unter milden Bedingungen mit der Carboxygruppe zum Säureiminiumchlorid, das sich mit dem vorhandenen Überschuss an NHS weiter zum Aktivester umsetzt. Während dieser Reaktionsschritte entstehen lediglich gasförmige Nebenprodukte (CO, CO₂, HCl) und regeneriertes DMF. Der Großteil des Säureiminiumchlorids wurde durch Erhöhung der Temperatur auf $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ umgesetzt und **NHS-CAP 2** mit einem MS_{NHS} = 0,38 wurde erhalten. Trotz des hohen Überschusses des Aktivierungsreagenzes (5 Äquiv. pro Carboxygruppe) fiel der MS_{NHS} geringer aus als bei **NHS-CAP 1** (1 Äquiv. pro Carboxygruppe). Effizienter gelang die Umsetzung des Säure-

iminiumchlorids bei einer Reaktionstemperatur von 60 °C und lieferte **NHS-CAP 3** mit einem $MS_{\text{NHS}} = 0,66$. Somit wurde eine vollständige Umsetzung der Phthalatgruppen des CAP ($DS_{\text{Ph}} = 0,69$) erreicht. Trotzdem wurde in beiden Derivaten ein geringer Chloranteil von 0,5 % (**NHS-CAP 2**) und 1,3 % (**NHS-CAP 3**) gemessen. Als Ursache für vorhandenes Chlor in den Proben kommen zum einen Säurechloride und zum anderen Desoxychlorogruppen infrage. Es ist in der Literatur bekannt, dass das Säureiminiumchlorid unter mäßigem Erhitzen zu Säurechlorid, HCl und DMF zerfällt.^[103] Während der Synthese erzeugte Säurechloride an CAP sollten aber erfahrungsgemäß bei Fällung und Waschen mit Ethanol zu Ethylestern abreagieren. Möglicherweise bleiben Säurechloride dabei in Spuren zurück. Reaktives OC könnte auch zur Bildung von Desoxychlorogruppen am Polymerrückgrat führen. Jedoch wurden in NMR-spektroskopischen Untersuchungen keine Signale im Bereich um 44 ppm gefunden, die diese Hypothese bestätigen würden (siehe Charakterisierung weiter unten). Desoxychlorogruppen werden an der C6-Position in PS typischerweise bei etwa 44 ppm beobachtet.^[137–139] In der Literatur finden sich widersprüchliche Berichte. Einerseits konnte durch NMR-Spektroskopie und Elementaranalyse nachgewiesen werden, dass nach Veresterung von PS mittels Iminiumchlorid kein Chlor in den Produkten vorhanden war und es damit zu keiner Chlorierung kam.^[106,107] Andererseits wurde auch berichtet, dass mithilfe von Iminiumchlorid synthetisierte PS-Ester geringe Spuren an Chlor (bis zu 2 %) enthielten, die aber nicht als Desoxychlorogruppen nachgewiesen werden konnten.^[17,104] Aufgrund des geringen Chlorgehalts der beiden Proben konnte die Ursache nicht abschließend geklärt werden. Letztendlich ist die Aktivierung mit Iminiumchlorid ungeeignet, um NHS-aktivierte CAP-Derivate mit definierter Struktur zu gewinnen.

Statt die Carboxygruppe des CAP wie in den bisher erwähnten Methoden zu aktivieren, wurde CAP direkt zu NHS-CAP mit Reagenzien umgesetzt, in denen NHS selbst aktiviert in Form eines Carbonats vorliegt. Mit DSC als solches Reagenz ließen sich NHS-Ester in einem Schritt mit guten Ausbeuten erzielen (Ansatz III in Abbildung 24b, Tabelle 10).^[132,140] Im Reaktionsverlauf deprotoniert Pyridin die Carboxygruppe des CAP und das gebildete Carboxylat-Anion greift nukleophil am Carbonylkohlenstoff des Carbonats an. Das abgespaltene NHS-Anion greift wiederum am Carbonylkohlenstoff der Carboxygruppe an und der NHS-Ester bildet sich. Als Nebenprodukte werden lediglich CO₂ und NHS gebildet.^[141] Durch Variation der Reaktionsbedingungen konnte der MS_{NHS} eingestellt werden und es wurden **NHS-CAP 4–7** erhalten. Bei 1 Äquiv. DSC pro Carboxygruppe und einer Temperatur von 20 °C trat keine Reaktion ein. Ein $MS_{\text{NHS}} = 0,14$ (**NHS-CAP 5**) wurde erreicht, indem die Reagenzmenge auf 3 Äquiv. gesteigert wurde. Die Reaktivität des DSC nahm bei einer Erhöhung der Temperatur auf 60 °C nochmals zu. Bei 3 bis 5 Äquiv. war es möglich etwa 70 % (**NHS-CAP 6**, $MS_{\text{NHS}} = 0,50$) und schließlich alle Carboxygruppen (**NHS-CAP 7**, $MS_{\text{NHS}} = 0,75$) in aktivierte NHS-Ester zu überführen. Im Rahmen der Messgenauigkeit der DS-Bestimmungsmethode kann von einer vollständigen Umsetzung aller verfügbaren Carboxygruppen zum

entsprechenden NHS-Ester ausgegangen werden. Hierbei ist anzumerken, dass der experimentelle Fehler der DS-Bestimmung verhältnismäßig hoch ist, was zu der augenscheinlichen Diskrepanz $DS_{Ph} < MS_{NHS}$ führt.

Als Alternative zum kommerziell erhältlichen DSC wurde DSO für die Synthese von NHS-CAP untersucht (Ansatz IV in Abbildung 24b, Tabelle 10). Das Oxalat wurde *in situ* in Gegenwart von CAP aus OC und NHS hergestellt und lieferte dabei CO, CO₂, HCl und NHS als Nebenprodukte. Mechanistisch verläuft die Reaktion ähnlich der Umsetzung mit DSC (vergleiche Abbildung 29a).^[132,142] Das durch Pyridin deprotonierte Carboxylat-Anion greift nukleophil an einem Carbonylkohlenstoff des Oxalats an. Infolgedessen wird CO freigesetzt und das abgespaltene NHS-Anion greift nukleophil am Carbonylkohlenstoff der Carboxygruppe an. Der NHS-Ester bildet sich und CO₂ sowie das NHS-Anion spalten sich ab. Es wurde mit diesem Reagenz ein hoher $MS_{NHS} = 0,49$ (**NHS-CAP 8**) bei 20 °C erreicht. Die Erhöhung der Reaktionstemperatur auf 60 °C führte zu einer kompletten Umsetzung der Carboxygruppen (**NHS-CAP 9**, $MS_{NHS} = 0,67$) zum NHS-Ester. Jedoch wurde in NMR-spektroskopischen Experimenten festgestellt, dass die Produkte einen geringen Anteil einer Nebenstruktur am Polymerrückgrat aufwiesen, die als Alkylcarbonat-substituenten identifiziert wurden. Da zudem ein hoher Überschuss an Reagenz (7 Äquiv. pro Carboxygruppe) notwendig war, wird diese Methode ebenfalls als ungeeignet für die Darstellung von NHS-CAP erachtet.

Die molekulare Struktur aller Produkte wurde mittels FT-IR- und NMR-Spektroskopie untersucht. Die erfolgreiche Synthese der NHS-CAP wurde durch FT-IR-Spektroskopie bestätigt (Abbildung 25). Das Spektrum von CAP zeigte eine intensive Bande bei 1739 cm⁻¹, die der Schwingung der Carbonylgruppe der Ester (C=O_{Ester}) zugeordnet wird. Im Spektrum der NHS-CAP-Derivate erschienen Banden bei 1809 cm⁻¹ und 1778 cm⁻¹ als Schulter der breiten Carbonylbande. Diese Banden werden durch die Schwingung der Carbonylgruppe des NHS-Esters in der Esterbindung (C=O_{Ester-NHS}) und durch die symmetrische Schwingung der beiden Carbonylgruppen des Succinimidylrings (ν_s C=O_{NHS}) verursacht.^[143]

Das ¹³C-NMR-Spektrum des CAP (Abbildung 26) zeigte typische Signale der modifizierten AGE von Celluloseestern bei ca. 62 ppm (C-6), 70 bis 81 ppm (C-2–5) und 99 bis 102 ppm (C-1 benachbart zu C-2, das mit Acetat- oder Phthalatgruppen modifiziert ist). Die Signale bei 20 ppm werden der Methyleinheit der Acetatgruppe (C-8) und bei 126 bis 134 ppm dem aromatischen Ring der Phthalatgruppe (C-10–15) zugeordnet. Im Bereich 164 bis 170 ppm wurden mehrere überlappende Signale beobachtet, die zu den Carbonylgruppen beider Ester (C-7 und C-9) an den verschiedenen Positionen 2, 3 oder 6 der AGE als auch zur Carboxygruppe (C-16) gehören. Das ¹³C-NMR-Spektrum der NHS-CAP-Derivate enthielt zusätzliche Signale, die die erfolgreiche Veresterung bestätigen. Ein charakteristisches Signal erschien bei 25 ppm und wird den Methylengruppen des Succinimidylrings (C-18) zugeordnet. Das Signal der Carbonylgruppen des Succinimidylrings (C-17) überlappte mit den Signalen der Carbonyleinheiten der Acetat- und Phthalatgruppen.^[144] Bei 162 ppm

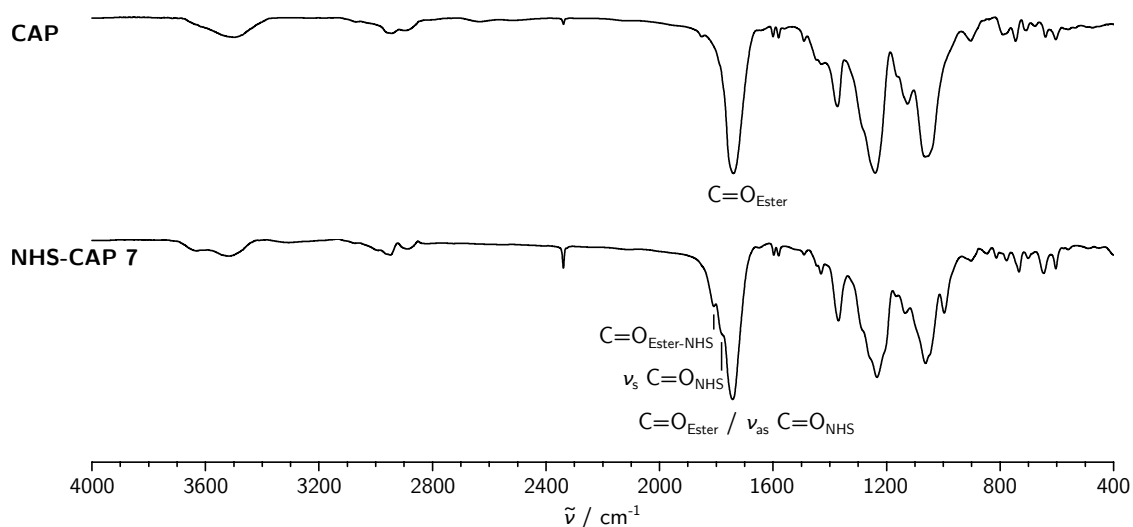


Abbildung 25. FT-IR-Spektren von Celluloseacetatphthalat (CAP) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**).

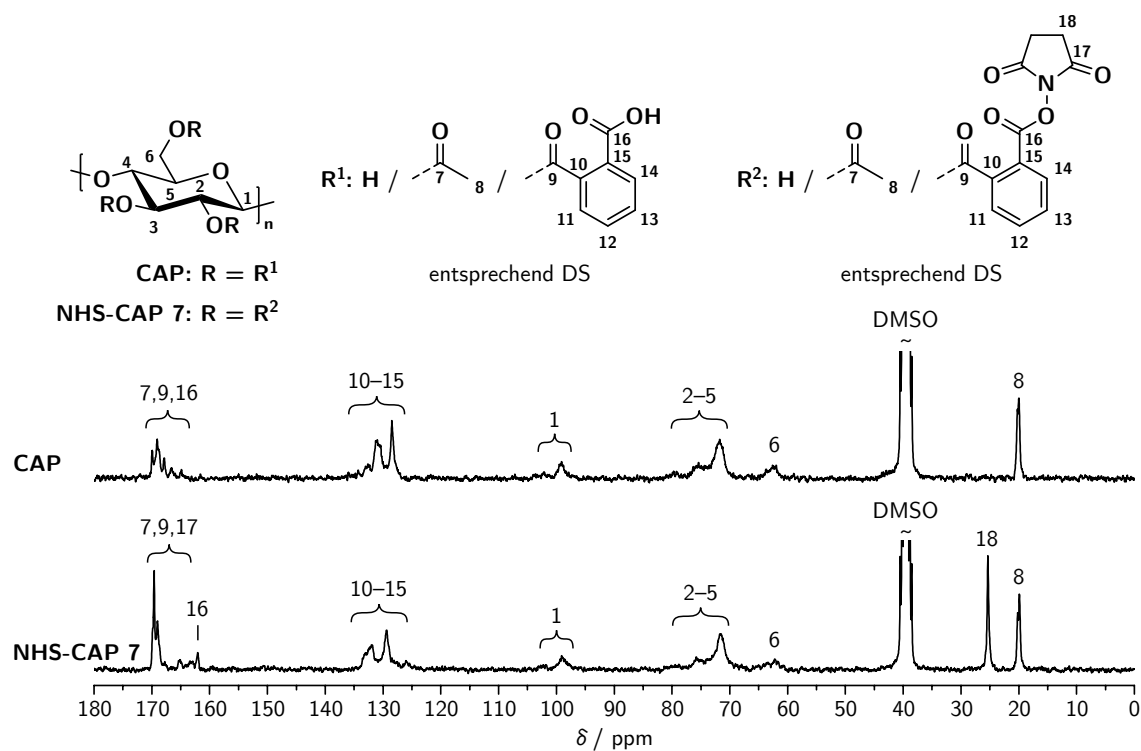


Abbildung 26. ^{13}C -NMR-Spektren von Celluloseacetatphthalat (CAP) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**), aufgenommen bei 60 °C in $\text{DMSO}-d_6$.

erschien ein neues Signal, das der Carbonylgruppe der gebildeten Esterbindung zwischen Phthalatgruppe und NHS (C-16) zugeordnet wird.

Der Vergleich zwischen den Spektren des CAP und des **NHS-CAP 7** ergibt keine signifikanten Unterschiede in den relativen Intensitäten der Signale, die zu Acetat- und Phthalatgruppen gehören. Dies weist darauf hin, dass beide Estergruppen während der Reaktion nicht abgespalten werden. Eine direkte und genaue Quantifizierung der DS und MS-Werte aus den Signalen im Spektrum der ^{13}C -NMR-Spektroskopie mit inverser gepulster Protonenentkopplung (*Inverse Gated Decoupling*) ist zwar möglich, führte aber im Fall von NHS-CAP-Derivaten zu unplausiblen Werten, da die Signale zu schwach ausfielen. Aus diesem Grund wurden für die quantitative Bestimmung ^1H -NMR-Spektren in deuteriertem Dimethylsulfoxid ($\text{DMSO}-d_6$) aufgenommen (Abbildung 27). Die Signale der Protonen für restliche Hydroxygruppen und Wasser wurden durch Zusatz von Trifluoressigsäure tieffeldverschoben, um eine Überlappung mit den Signalen im Bereich der AGE zu verhindern. Damit war es möglich, die Signale der AGE (als interne Referenz), des aromatischen Bereichs (für DS_{Ph}), der Methylengruppen des Succinimidylrings (für MS_{NHS}) und der Methyleneinheit der Acetatgruppe (für DS_{Ac}) getrennt zu integrieren. Auf diese Weise wurden für **NHS-CAP 7** die Werte $\text{DS}_{\text{Ac}} = 1,89$, $\text{DS}_{\text{Ph}} = 0,68$ und $\text{MS}_{\text{NHS}} = 0,73$ erhalten. Die Elementaranalyse von **NHS-CAP 7** ergab unter der Annahme, dass sich der anfängliche DS beider Estergruppen nicht ändert, die Werte $\text{DS}_{\text{Ac}} = 1,98$, $\text{DS}_{\text{Ph}} = 0,69$ und $\text{MS}_{\text{NHS}} = 0,75$. In den Grenzen des experimentellen Fehlers beider Bestimmungsmethoden wurden somit annähernd gleiche Werte gemessen. Die DS- und MS-Werte wurden deshalb aus den Messwerten der Elementaranalyse bestimmt, da diese Methode schnell und einfach durchzuführen ist.

Die Produkte **NHS-CAP 8** und **9**, die mit DSO hergestellt wurden, zeigten zusätzliche Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum (Abbildung 28), die charakteristisch für Alkylcarbonatgruppen sind.^[145] Das Signal bei 157 ppm lässt sich der Carbonat-

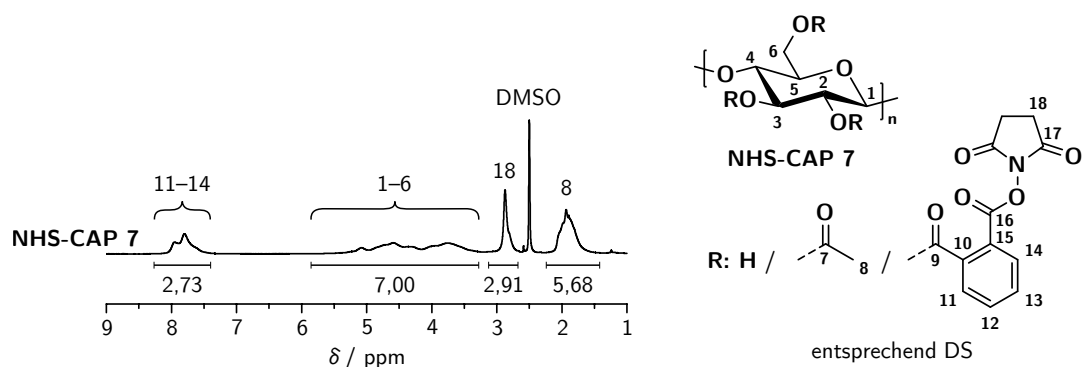


Abbildung 27. ^1H -NMR-Spektrum von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**), aufgenommen bei 60 °C in $\text{DMSO}-d_6$ nach Zusatz von Trifluoressigsäure.

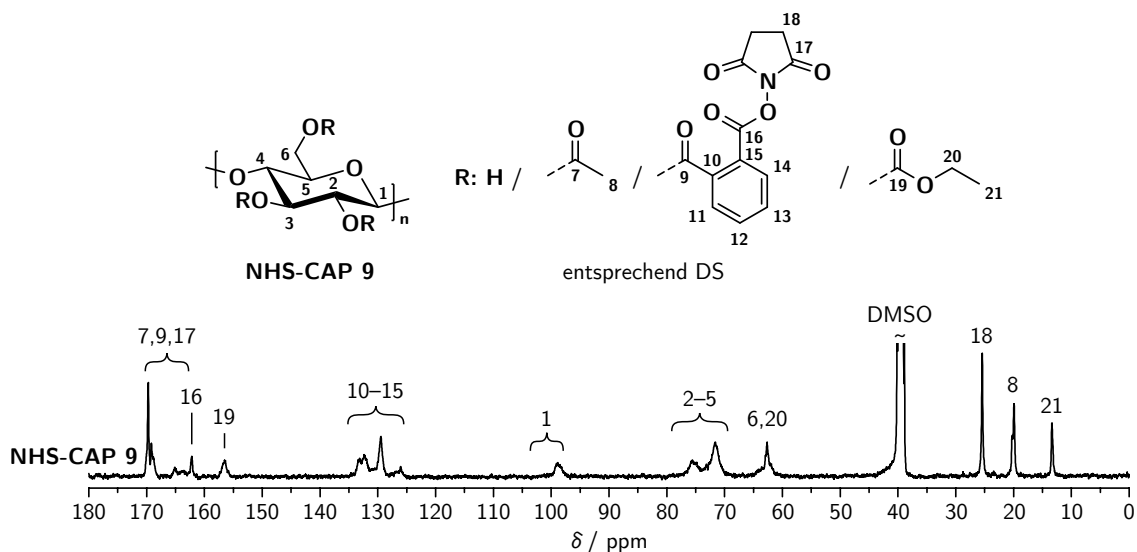


Abbildung 28. ^{13}C -NMR-Spektrum von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP-9), aufgenommen bei 60 °C in $\text{DMSO}-d_6$.

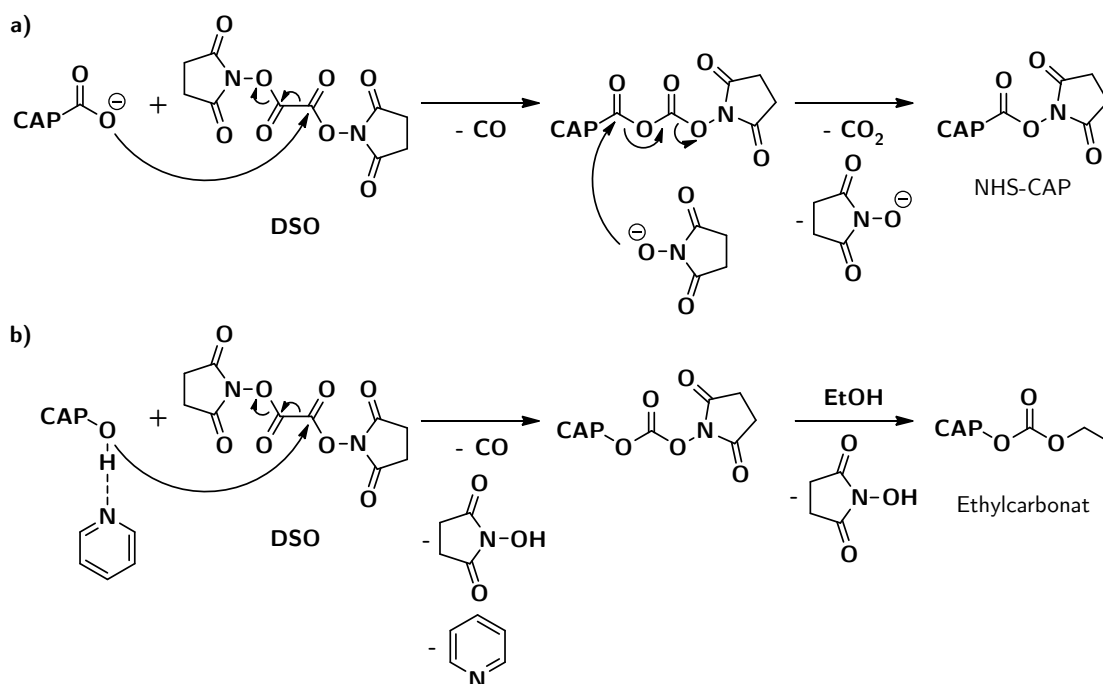


Abbildung 29. a) Reaktionsmechanismus der Bildung von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP) durch Umsetzung der Carboxygruppen von Celluloseacetatphthalat (CAP) mit *N,N'*-Disuccinimidylloxalat (DSO). b) Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die Bildung von Ethylcarbonaten durch Umsetzung der restlichen Hydroxygruppen am Polymerrückgrat nach Aktivierung mit Pyridin.

gruppe und das Signal bei 13 ppm der Methyleinheit der Ethylgruppe zuordnen. Das Signal der Methyleinheit der Ethylgruppe erschien bei 63 ppm und überlappt mit dem Signal von C-6, was an der erhöhten Intensität des Signals zu erkennen ist. Vermutlich wurden Ethylcarbonate während der Aufarbeitung der Produkte in Ethanol gebildet. Im vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus werden zusätzlich zu den Carboxygruppen auch Hydroxygruppen am Polymerrückgrat des CAP aktiviert (Abbildung 29b). Pyridin erweitert dabei den O-H-Abstand und erhöht die Reaktivität der Hydroxygruppen, die nukleophil am Carbonylkohlenstoff des DSO angreifen.^[142] Es bildet sich eine NHS-aktivierte Carbonatstruktur, die mit Ethanol während dem Fällern und Waschen zum Ethylcarbonat reagiert.

Aus den genannten Gründen wurde die Herstellung von NHS-CAP mithilfe von DSC favorisiert. Das Produkt **NHS-CAP 7** weist eine vollständige Funktionalisierung mit NHS-Estern und eine definierte molekulare Struktur ohne unerwünschte Nebenprodukte auf. Deshalb bildet **NHS-CAP 7** die Grundlage für die Derivatisierung und Bildung reaktiver Nanopartikel in den folgenden Experimenten.

6.1.2. Umsetzung mit Aminen

Aktivester reagieren leicht mit verschiedenen Nukleophilen. Die Reaktivität beruht dabei auf der erhöhten Elektrophilie des Carbonylkohlenstoffs des Esters.^[141] Im Fall von NHS-Estern ist die Ursache dafür das Imid, das mit seinen beiden Carbonylgruppen einen elektronenziehenden mesomeren Effekt ($-M$ -Effekt) auf die Esterbindung ausübt. Das Amin greift den Aktivester nukleophil an und es bildet sich das entsprechende Amid. Die Reaktivität der Aktivester der gewonnenen NHS-CAP gegenüber Aminen wurde untersucht, indem **NHS-CAP 7** mit 4-Chlorbenzylamin (1 Äquiv. pro NHS-Estergruppe) homogen in DMA umgesetzt wurde (Abbildung 30). Bei milden Reaktionsbedingungen von 20 °C wurde nach 2 h Celluloseacetat-*N*-(4-chlorbenzyl)phthalamat (CB-CAP) erhalten.

Die 4-Chlorbenzylaminogruppe (CB) wurde mit einem $MS_{CB} = 0,68$ gebunden, das auf eine vollständige Umsetzung aller NHS-Estergruppen hinweist und mit spektroskopischen Experimenten bestätigt wurde. Im FT-IR-Spektrum des CB-CAP waren die Banden des NHS-Esters als Schulter der Schwingung der Carbonylgruppe des Esters ($C=O_{Ester}$) nicht mehr vorhanden (Abbildung 31). Dafür wurden zwei neue Banden bei 1659 cm^{-1} und 1533 cm^{-1} beobachtet, die der Valenzschwingung der Carbonylgruppe ($C=O_{Amid-I}$) und der Deformationsschwingung des Amids ($N-H_{Amid-II}$) zugeordnet werden.^[146] Das ^{13}C -NMR-Spektrum des CB-CAP wies erneut die Signale des CAP auf, d. h. der AGE und der Acetat- sowie Phthalatgruppen (Abbildung 32). Darüber hinaus war das Signal für die Methylengruppen des Succinimidylrings (25 ppm) gänzlich verschwunden. Dieser Befund belegt, dass keine restlichen NHS-Ester im Produkt verblieben sind. Das betrifft auch das Signal für die Carbonylgruppe der Esterbindung zwischen Phthalatgruppe und NHS (C-16), das nicht mehr bei 162 ppm auftrat. Das Signal der Carbonylgruppe des Amids (C-16) überlappt sich

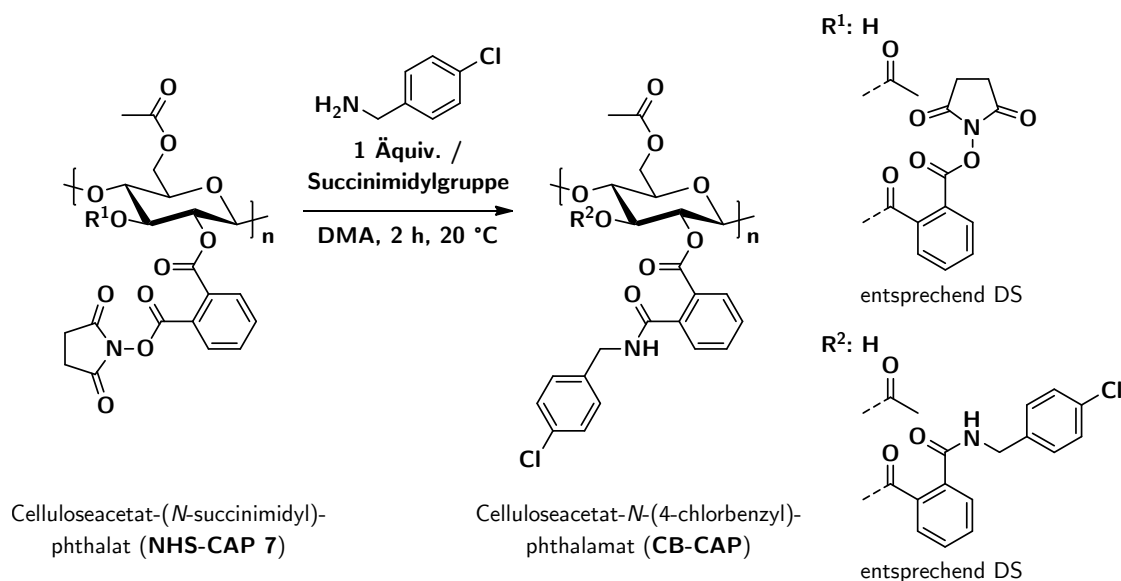


Abbildung 30. Umsetzung von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**) mit 4-Chlorbenzylamin zu Celluloseacetat-*N*-(4-chlorobenzyl)phthalamat (**CB-CAP**).

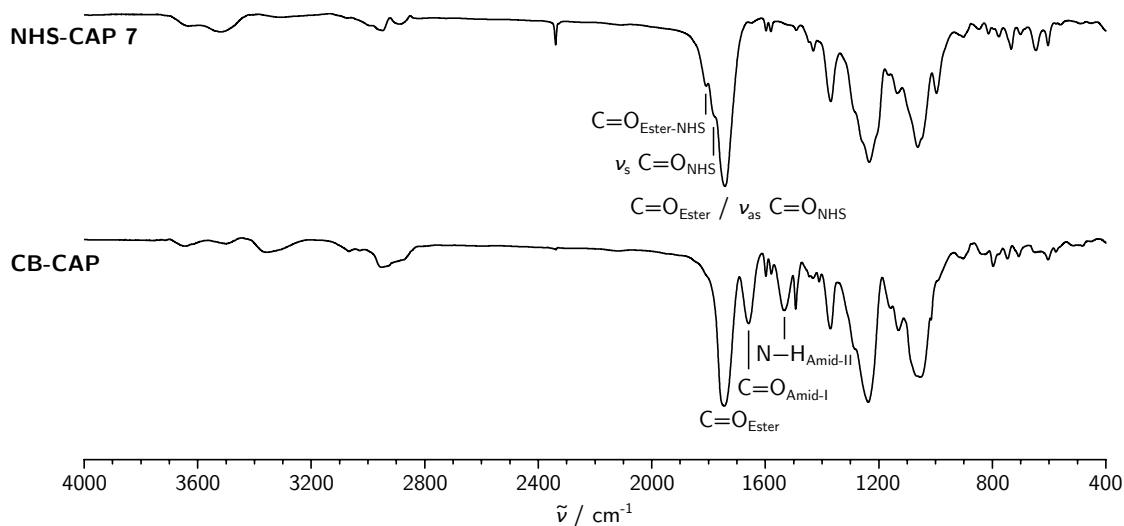


Abbildung 31. FT-IR-Spektren von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**) und Celluloseacetat-*N*-(4-chlorobenzyl)phthalamat (**CB-CAP**).

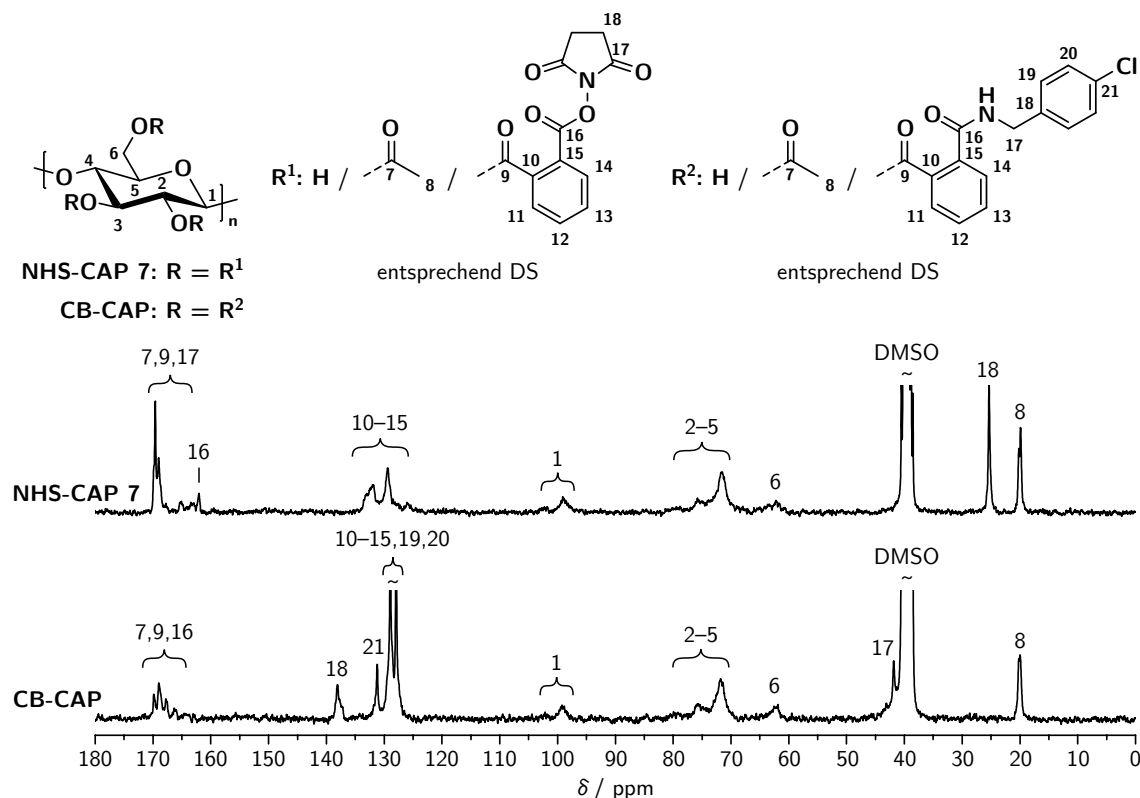


Abbildung 32. ^{13}C -NMR-Spektren von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP 7) und Celluloseacetat-*N*-(4-chlorbenzyl)phthalamat (CB-CAP), aufgenommen bei 60 °C in DMSO- d_6 .

weiter im Tieffeld mit den Signalen der Carbonyleinheiten von Acetat- und Phthalatgruppen. Es wurden charakteristische Signale im aromatischen Bereich bei 128 bis 138 ppm beobachtet, die zum Phenylring des CB (C-18–21) gehören und zusammen mit den Signalen der Phthalatgruppe auftraten. Das Signal der Methylengruppe von CB (C-17) erschien bei 42 ppm als Schulter des Lösungsmittelsignals.

Die Umsetzung der NHS-CAP mit Nukleophilen wie Aminen gelang vollständig bei milden Reaktionsbedingungen. Die Ergebnisse demonstrieren das Potenzial von Aktivestern des CAP als mögliche Plattform für die Synthese funktioneller Cellulosederivate. Zudem stützen die Ergebnisse die Annahme, dass sich das entwickelte Konzept der homogenen Umsetzung ebenso im wässrigen Medium an der Oberfläche reaktiver PS-NP nutzen lässt.

6.2. Reaktive Nanopartikel

Nach der Synthese der CAP-Aktivester (siehe Abschnitt 6.1) war der nächste Schritt die Bildung, Charakterisierung und Funktionalisierung reaktiver PS-NP. Für die folgenden Experimente wurde das Derivat **NHS-CAP 7** genutzt, da es eine definierte molekulare Struktur aufwies und komplett mit NHS-Estergruppen funktionalisiert war.

6.2.1. Herstellung und Charakterisierung

In Abschnitt 5.1.1 wurde dargelegt, dass sich CA und CAP zu sphärischen NP anordnen, hervorgerufen durch den Austausch des Lösungsmittels gegen das Fällungsmittel Wasser. Dieser Ansatz der Dialyse wurde genutzt, um NP aus **NHS-CAP 7** mit ähnlicher Form herzustellen (Abbildung 34). Das Derivat formte NP mit einem Durchmesser von ungefähr 200 bis 400 nm und einer verhältnismäßig schmalen Verteilung mit $PDI \approx 0,1$ (Tabelle 11, **NHS-CAP-NP 1–4**). Wie bereits für CAP festgestellt, nahm auch mit steigender Konzentration des **NHS-CAP 7** der Partikeldurchmesser stetig zu. Diese Steigerung entspricht den Mechanismen während der Selbstanordnung (Nukleation und Wachstum, Nukleation und Aggregation, siehe Abschnitte 2.1 und 5.1.1).^[42] Im Vergleich waren **NHS-CAP-NP 2** etwa 100 nm kleiner als **CAP-NP 5** bei gleicher Polymerkonzentration ($\beta_{\text{Polymer}} = 4 \text{ mg ml}^{-1}$). Dieser Unterschied wird möglicherweise durch die Ladungen des Polyelektrolyts CAP hervorgerufen, die eine kompaktere Selbstanordnung durch gegenseitige elektrostatische Abstoßung beeinträchtigen. Für NHS-CAP ist das nicht der Fall, da es nur hydrophobe Acetat- und Aktivestergruppen aufweist. Generell weisen die reaktiven Partikel eine hohe Stabilität auf. **NHS-CAP-NP 2** (243 nm, $PDI = 0,12$) veränderten sich nach einer Standzeit von einem Monat (247 nm, $PDI = 0,14$) nicht.

In Bezug auf die spätere Nutzung der reaktiven PS-NP war die Stabilität der Aktivester gegen Hydrolyse während der Dialyse und Lagerung der wässrigen Suspension ein entscheidendes Kriterium. Für die Ermittlung der molekularen Struktur wurde die Suspension **NHS-CAP-NP 2** lyophilisiert und der erhaltene Feststoff mit FT-IR- und in gelöster Form mit NMR-Spektroskopie untersucht (Abbildung 33 und 35). Beide Spektren der lyophilisierten Partikel **NHS-CAP-NP 2** waren identisch mit den Spektren des Ausgangsderivats **NHS-CAP 7**. Dies wurde auch mit Elementaranalyse bestätigt, da der Gehalt der NHS-Estergruppen des Derivats (**NHS-CAP 7**) mit $MS_{\text{NHS}} = 0,75$ im Vergleich zu lyophilisierten Partikeln (**NHS-CAP-NP 2**) mit $MS_{\text{NHS}} = 0,74$ konstant blieb. Es traten somit keine merklichen Veränderungen in der molekularen Struktur des Derivats während der Bildung und Lagerung der NP auf. Dies ist eine grundlegende Voraussetzung für die folgende Funktionalisierung der NHS-CAP-NP im wässrigen Medium.

Neben der molekularen Struktur des Derivats ist die Stabilität der reaktiven PS-NP unter Änderung des pH-Werts ein weiteres wichtiges Kriterium, die für die Funk-

Tabelle 11. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP), hergestellt aus Celluloseacetat (CA), Celluloseacetatphthalat (CAP) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**) mittels Dialyse.

Nr.	Celluloseester	β_{Polymer}^a mg ml^{-1}	d^b nm	PDI ^b
NHS-CAP-NP 1	NHS-CAP 7	2	199 ± 2	$0,09 \pm 0,02$
NHS-CAP-NP 2	NHS-CAP 7	4	243 ± 3	$0,12 \pm 0,03$
NHS-CAP-NP 3	NHS-CAP 7	6	336 ± 1	$0,14 \pm 0,01$
NHS-CAP-NP 4	NHS-CAP 7	8	386 ± 3	$0,11 \pm 0,01$
CA-NP 5	CA	4	426 ± 12	$0,08 \pm 0,02$
CAP-NP 5	CAP	4	335 ± 6	$0,12 \pm 0,01$

^a Massenkonzentration des Polymers (β_{Polymer}) in einer Lösung in *N,N*-Dimethylacetamid vor der Dialyse.

^b Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP), bestimmt durch dynamische Lichtstreuung (DLS).

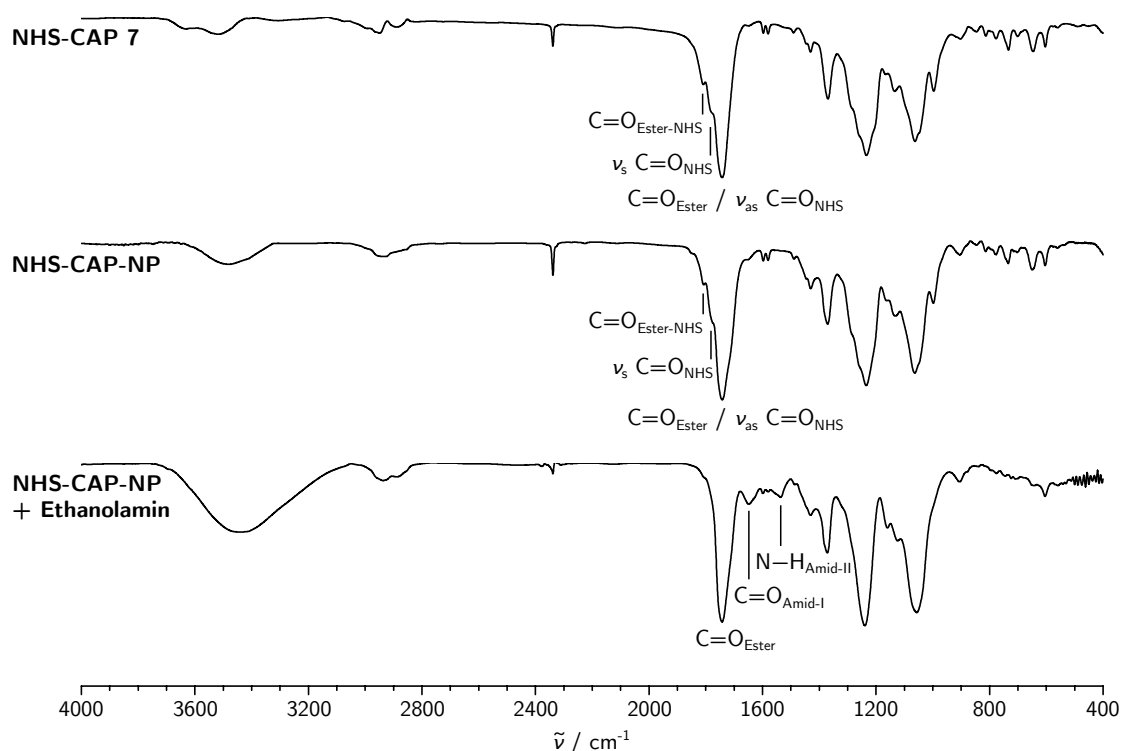


Abbildung 33. FT-IR-Spektren des Derivats Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**), dessen Nanopartikel sowie dessen Nanopartikel funktionalisiert mit Ethanolamin.

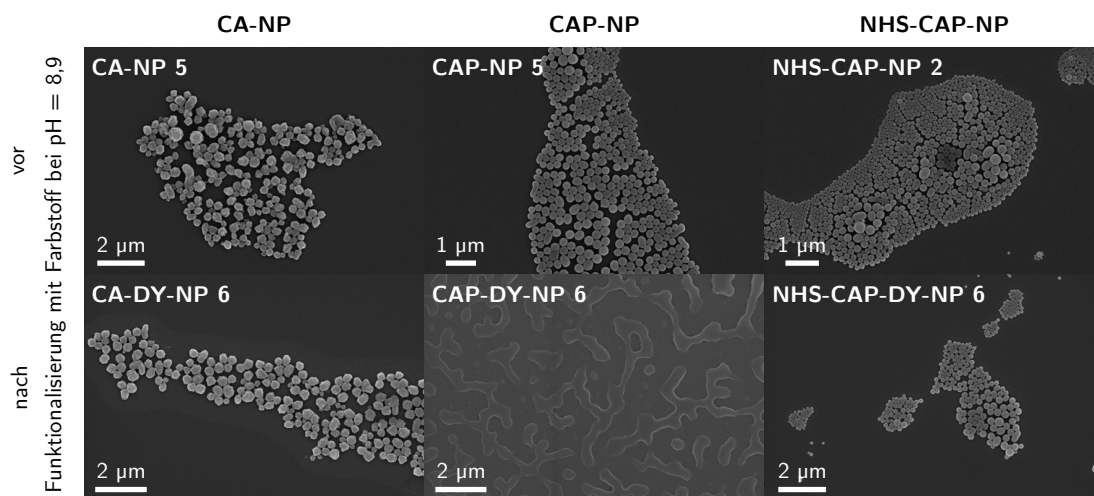


Abbildung 34. REM-Aufnahmen von Nanopartikeln (NP), hergestellt aus Celluloseacetat (**CA-NP 5** und **CA-DY-NP 6**), Celluloseacetatphthalat (**CAP-NP 5** und **CAP-DY-NP 6**) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP-NP 2** und **NHS-CAP-DY-NP 6**), vor und nach der Behandlung mit dem Farbstoff DY-605 (DY) in Boratpuffer (pH = 8,9).

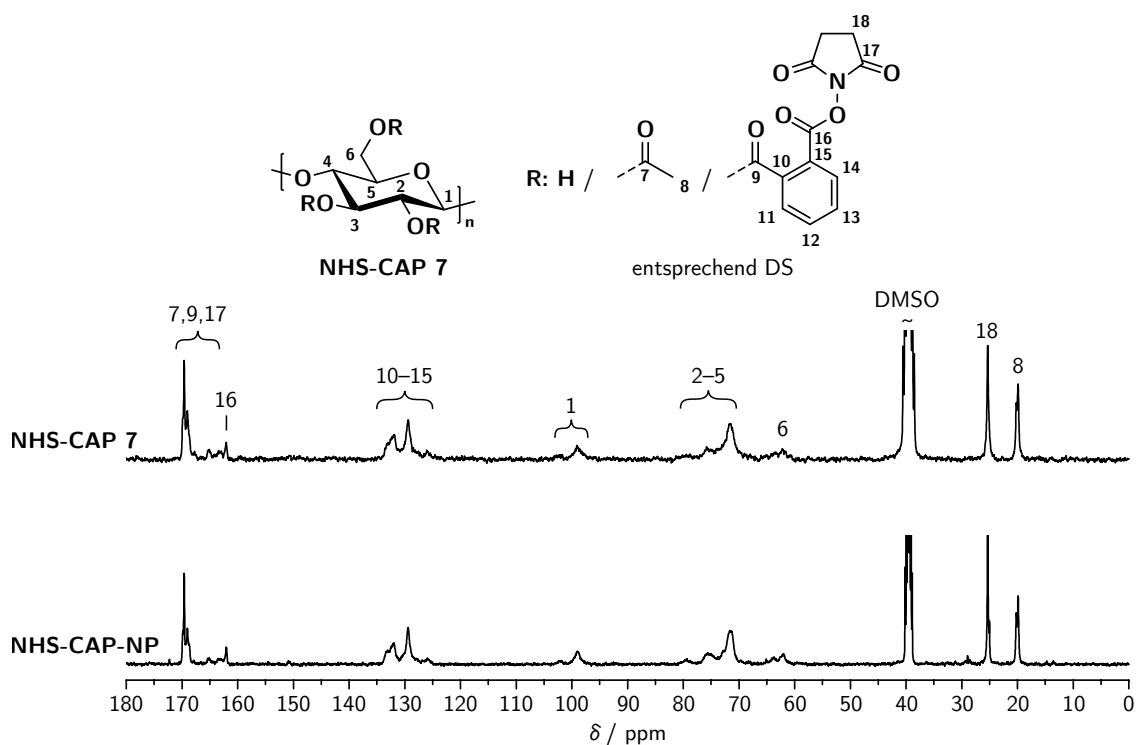


Abbildung 35. ^{13}C -NMR-Spektren von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**) vor und nach der Partikelbildung, aufgenommen in $\text{DMSO}-d_6$.

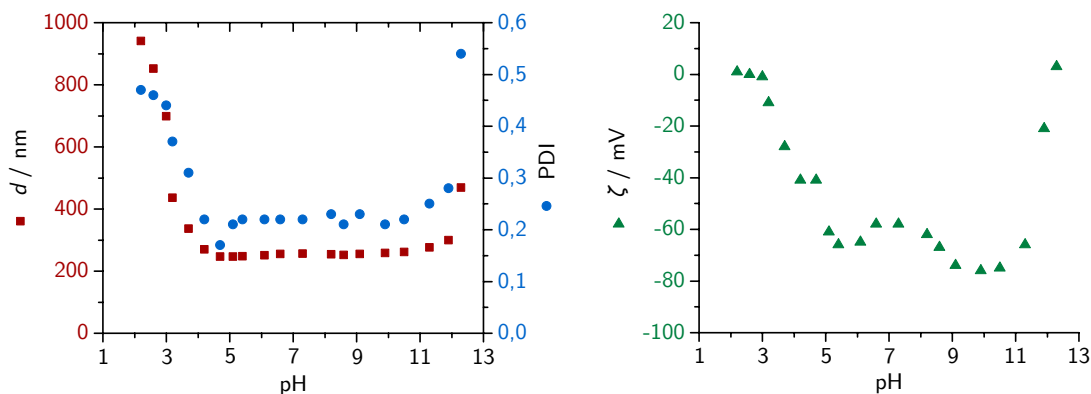


Abbildung 36. Durchmesser (d), Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotenzial (ζ) der Nanopartikel von Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP-NP 2**) in Abhängigkeit des pH-Werts während der Titration.

tionalisierung im wässrigen Medium notwendig ist. Für die Ermittlung der Partikelstabilität wurde die Suspension **NHS-CAP-NP 2** titriert und die Eigenschaften der Partikel in Abhängigkeit des pH-Werts bestimmt (Abbildung 36). Im pH-Bereich von ca. 4 bis 11 waren die reaktiven NHS-CAP-NP stabil, das an der konstanten Partikelgröße (ca. 240 nm) und Breite der Größenverteilung (PDI \approx 0,22) zu erkennen war. Unter sauren Bedingungen (pH < 4) aggregierten die Partikel, was sich durch einen rapiden Anstieg der beiden Werte bis über 900 nm und PDI = 0,4 äußerte. Im basischen Bereich (pH > 11) entsprachen die gesteigerten Messwerte jedoch keiner Aggregation, da visuell beobachtet wurde, dass sich die Partikel auflösten. Als Maß für die kolloidale Stabilität spiegelt das gemessene Zetapotenzial das Verhalten der Partikel wider. Im pH-Bereich von 4 bis 11, in dem die Partikelgröße konstant war, wiesen die Partikel ein stark ausgeprägtes Potenzial (–75 bis –60 mV) auf, welches das Kolloid ausreichend stabilisiert. Bereits ein Zetapotenzialbetrag über 30 mV reicht aus, damit ein Kolloid stabil genug ist (siehe Abschnitt 2.2).^[54] Im sauren Bereich erhöht sich die Konzentration an Protonen im Medium, die adsorbierte Hydroxidionen und damit das negative Potenzial der Partikel bis zu 0 mV zunehmend kompensieren. Die fehlende elektrische Abstoßung der Partikel führt zu deren Aggregation. Im basischen Bereich bis pH = 10 sank das Zetapotenzial zunächst auf –75 mV ab. Durch die steigende Konzentration der Hydroxidionen nimmt deren adsorbierter Anteil an der Partikeloberfläche zu und verursacht demnach die beobachtete Potenzialabnahme. Bei weiterer Erhöhung des pH-Werts über 11 werden jedoch auch vermehrt NHS-Estergruppen gespalten, die mit zunehmenden pH-Wert instabiler sind.^[123,124] Ähnlich dem Polyelektrolyt CAP führen die zurückbleibenden deprotonierten Carboxygruppen zur erhöhten Löslichkeit des Derivats und die Partikel lösten sich auf.

Die Breite der Größenverteilung von **NHS-CAP-NP 2** während der Titration

(PDI $\approx 0,22$) schien gegenüber dem Wert der ursprünglichen DLS-Messung (PDI = 0,12) geringfügig erhöht. Dies könnte auf die mechanische Belastung der Partikel zurückzuführen sein, die durch Umwälzen der Suspension mittels Pumpe während der Titration auftraten.

6.2.2. Funktionalisierung mit Fluoreszenzfarbstoff

Es wurde angenommen, dass reaktive PS-NP mit aktivierten NHS-Estergruppen im wässrigen Medium mit Verbindungen reagieren, die nukleophile Aminogruppen enthalten und stabile Amidbindungen ausbilden. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die wässrige Suspension **NHS-CAP-NP 2** mit Ethanolamin (1 Äquiv. pro NHS-Estergruppe) umgesetzt. Das FT-IR-Spektrum der funktionalisierten Partikel nach Lyophilisierung zeigte klar die Banden für Schwingungen der erwarteten Amidbindung bei 1651 cm^{-1} ($\text{C=O}_{\text{Amid-I}}$) und 1537 cm^{-1} ($\text{N-H}_{\text{Amid-II}}$, Abbildung 33). Außerdem wurde der NHS-Ester entfernt, da die Schulterbanden für die Schwingungen des Succinimidylrings $\text{C=O}_{\text{Ester-NHS}}$ (1809 cm^{-1}) und $\nu_s \text{ C=O}_{\text{NHS}}$ (1778 cm^{-1}) verschwanden.

Für umfassende Experimente zur Funktionalisierung der reaktiven PS-NP wurde ein aminfunktionalisierter Farbstoff DY-605 (DY) mit starker Fluoreszenz (Emissionsmaximum bei 617 nm in Wasser und 634 nm in DMSO, Abbildung 37) verwendet. Einerseits liefert die Funktionalisierung mit Farbstoff Informationen über die Bindungseffizienz bei unterschiedlichen Reaktionsbedingungen, die mittels UV/Vis- und/oder Fluoreszenzspektroskopie quantitativ bestimmt werden kann. Andererseits sind gefärbte PS-NP von großem Interesse für Anwendungen wie z. B. Sensoren in der Bioanalytik oder Immunassays. Die hier gezeigten reaktiven NHS-CAP-NP besitzen in diesem Zusammenhang großes Potenzial, da sie mit mehreren funktionellen Molekülen modifiziert werden können.

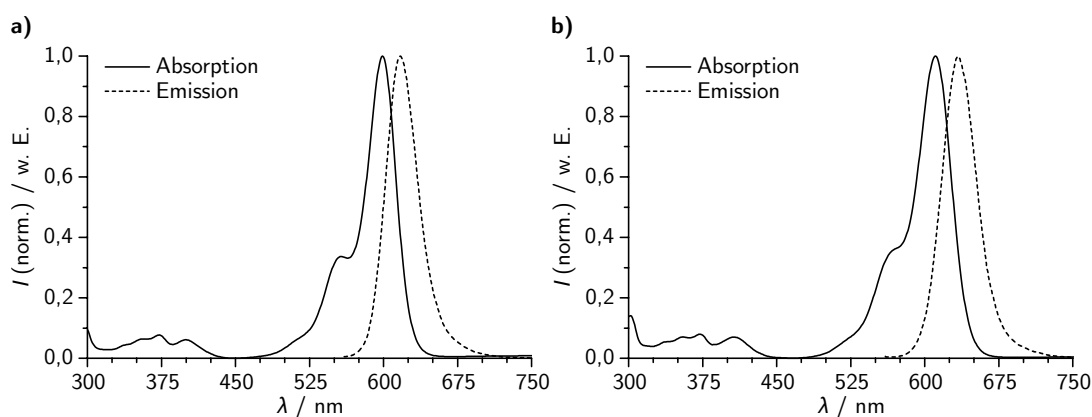


Abbildung 37. UV/Vis- und Fluoreszenzemissionsspektren (normalisiert) des Farbstoffs DY-605, gelöst in **a)** Wasser und **b)** Dimethylsulfoxid.

In Abschnitt 5.2 wurde bereits dargelegt, dass die Kopplungseffizienz von NHS-Linkern mit Nukleophilen wie Aminen im Wasser vom pH-Wert abhängig ist und durch zwei konkurrierende Reaktionen bestimmt wird. Die Rate der Amidbildung nimmt mit sinkendem pH-Wert (4,5 bis 7,0) ab, wohingegen die unerwünschte Hydrolyse des NHS-Esters bei hohem pH-Wert (7,0 bis 9,0) zunehmend bevorzugt ist. In der Kopplung empfindlicher Biomoleküle werden deshalb pH-Werte im Bereich von 4,0 bis 9,0 als optimal angesehen, abhängig von der Art des Substrats und des zu bindenden Biomoleküls.^[123,124] Aus diesem Grund wurden zwei pH-Werte für die Immobilisierung des Farbstoffs gewählt: leicht sauer in MES-Puffer (pH = 6,5) und basisch in Boratpuffer (pH = 8,9). Die wässrigen Suspensionen der aktivierten **NHS-CAP-NP 2** als auch der nicht reaktiven **CA-NP 5** und **CAP-NP 5** wurden mit verschiedenen Mengen Farbstoff bei diesen zwei pH-Werten behandelt. Ziel war dabei, die kovalente Bindung des Farbstoffs an aktivierten NHS-CAP-NP gegenüber einer adsorptiven bzw. elektrostatischen Bindung an nicht reaktiven Partikeln (CA- und CAP-NP) zu untersuchen. Nachdem die so behandelten Partikel mittels Dialyse gereinigt wurden, erfolgte die Messung der Partikelgrößen (Tabelle 12) und die Aufnahme ihrer Fluoreszenzspektren (Abbildung 38a).

Der Durchmesser der NHS-CAP-NP (≈ 240 nm) wurde weder von einer Änderung des pH-Werts im Bereich 4 bis 11, wie in den vorangegangenen Titrationsexperimenten gezeigt, noch von der gesamten Vorgehensweise der Farbstoffmodifizierung beeinflusst (Tabelle 12). Die gefärbten Partikel behielten ebenfalls ihre sphärische Form (Abbildung 34). Die Partikelgröße der CA-NP und CAP-NP war nach der Behandlung mit Farbstoff ähnlich bzw. leicht angestiegen. Die teilweise Aggregation wird womöglich durch die schwache nicht kovalente Wechselwirkung mit dem Farbstoff hervorgerufen. Besonders bei hohen Farbstoffkonzentrationen würde das die sehr breite Größenverteilung von **CAP-DY-NP 3** ($PDI \approx 0,4$) erklären, infolgedessen der scheinbar kleine Partikeldurchmesser nicht zuverlässig war. Es ist dabei festzuhalten, dass bei der Behandlung von CAP-NP in Boratpuffer (pH = 8,9) keine Partikel (**CAP-DY-NP 4–6**) erhalten wurden. Bei hohen pH-Werten werden die Carboxygruppen zu Carboxylat-Anionen deprotoniert und CAP wird wasserlöslich. Deshalb wurde eine klare wässrige Lösung statt einer trüben Suspension erhalten und es waren auch keine verbliebenen sphärischen Partikel mit REM nachweisbar. Stattdessen blieb ein diskontinuierlicher Polymerfilm nach Entfernen des Wasser zurück (**CAP-DY-NP 6**, Abbildung 34).

Fluoreszenzspektren der Suspensionen mit Farbstoff behandelter Partikel wurden aufgenommen und die Fläche unter der Fluoreszenzemissionskurve wurde quantifiziert (Abbildung 38). Die Fluoreszenzspektren der Suspensionen gefärbter Partikel (Abbildung 38a) glichen in Gestalt und Emissionsmaximum mit 618 nm dem Spektrum des reinen Farbstoffs, gelöst in Wasser (Abbildung 37a). Wie weiter unten ausgeführt, ist eine direkte Quantifizierung der gebundenen Farbstoffmenge für wässrige Suspensionen nicht möglich, weil Quenching- oder Verstärkungseffekte die Ergebnisse verfälschen können. Aus diesem Grund war zunächst nur ein semiquantitativer

Tabelle 12. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP) von Celluloseacetat (CA), Celluloseacetatphthalat (CAP) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP 7**), vor und nach der Behandlung mit Farbstoff DY-605 (DY) in 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (pH = 6,5) bzw. in Boratpuffer (pH = 8,9).

Nr. ^a	Celluloseester	Bedingungen		d^b nm	PDI ^b
		RFM ^c $\mu\text{mol g}^{-1}$	pH		
NHS-CAP-NP 2	NHS-CAP 7	-	-	243 ± 3	$0,12 \pm 0,03$
NHS-CAP-DY-NP 1	NHS-CAP 7	0,36	6,5	242 ± 2	$0,15 \pm 0,02$
NHS-CAP-DY-NP 2	NHS-CAP 7	3,60	6,5	243 ± 4	$0,13 \pm 0,03$
NHS-CAP-DY-NP 3	NHS-CAP 7	18,0	6,5	240 ± 2	$0,14 \pm 0,02$
NHS-CAP-DY-NP 4	NHS-CAP 7	0,36	8,9	241 ± 2	$0,13 \pm 0,01$
NHS-CAP-DY-NP 5	NHS-CAP 7	3,60	8,9	242 ± 0	$0,13 \pm 0,02$
NHS-CAP-DY-NP 6	NHS-CAP 7	18,0	8,9	243 ± 2	$0,14 \pm 0,02$
CA-NP 5	CA	-	-	426 ± 12	$0,08 \pm 0,02$
CA-DY-NP 1	CA	0,36	6,5	493 ± 9	$0,17 \pm 0,02$
CA-DY-NP 2	CA	3,60	6,5	458 ± 1	$0,14 \pm 0,03$
CA-DY-NP 3	CA	18,0	6,5	450 ± 5	$0,27 \pm 0,04$
CA-DY-NP 4	CA	0,36	8,9	434 ± 9	$0,11 \pm 0,01$
CA-DY-NP 5	CA	3,60	8,9	415 ± 5	$0,08 \pm 0,04$
CA-DY-NP 6	CA	18,0	8,9	464 ± 7	$0,25 \pm 0,01$
CAP-NP 5	CAP	-	-	335 ± 6	$0,12 \pm 0,01$
CAP-DY-NP 1	CAP	0,36	6,5	417 ± 3	$0,15 \pm 0,00$
CAP-DY-NP 2	CAP	3,60	6,5	448 ± 6	$0,07 \pm 0,01$
CAP-DY-NP 3	CAP	18,0	6,5	199 ± 3	$0,39 \pm 0,03$

^a CAP-DY-NP 4–6: CAP-NP lösten sich bei pH = 8,9 auf.

^b Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der NP, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung (DLS).

^c Relative Farbstoffmenge (RFM): eingesetzte Stoffmenge des Farbstoffs DY-605 (n_{DY}) pro Masse der Nanopartikel (m_{NP}) in $\mu\text{mol g}^{-1}$, basierend auf Nanopartikeln in wässriger Suspension (ca. $\beta_{\text{NP}} = 2,4 \text{ mg ml}^{-1}$).

Vergleich der Bindungseffizienz der verschiedenen NP realisierbar. Dafür wurde der Flächeninhalt unter der Fluoreszenzemissionskurve durch Integration bestimmt und auf die ursprüngliche Massenkonzentration der Suspensionen bezogen. Es ergab sich die relative Fluoreszenzfläche (RFF) in ml mg^{-1} (Abbildung 38b).

Für Kopplungsreaktionen bei pH = 6,5 wurde für alle Partikel nur eine schwache Fluoreszenz detektiert und kein signifikanter Unterschied zwischen den NP verschiedener Polymere festgestellt (Abbildung 38b links). Die sukzessive Erhöhung der ein-

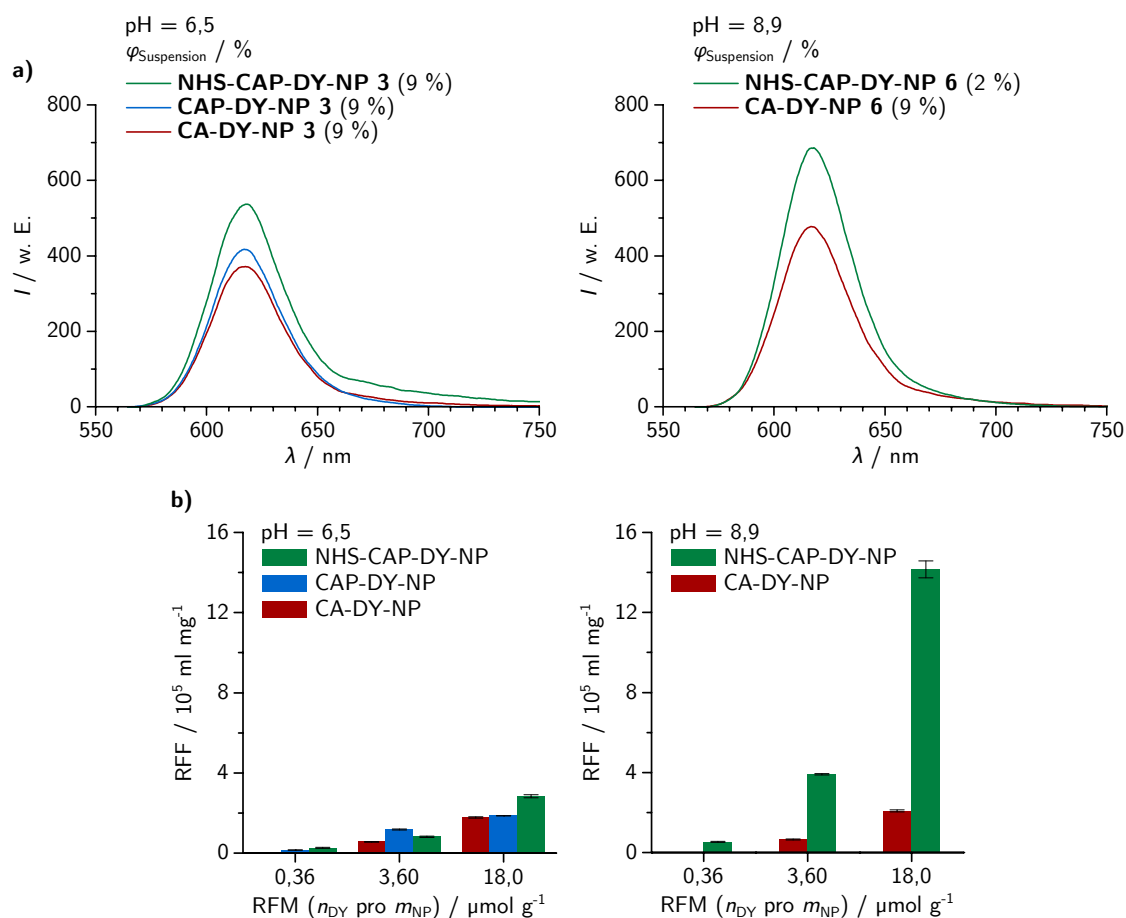


Abbildung 38. a) Fluoreszenzemissionsspektren und b) relative Fluoreszenzfläche (RFF) unter der Emissionskurve der wässrigen Suspensionen der Nanopartikel (NP), hergestellt aus Celluloseacetat (CA), Celluloseacetatphthalat (CAP) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP) nach der Funktionalisierung mit Farbstoff DY-605 (DY) bei einem pH-Wert von 6,5 und 8,9. Die gewonnenen Suspensionen wurden vor der Messung auf die entsprechenden Volumenanteile ($\varphi_{\text{Suspension}}$) verdünnt. RFF: korrigierte Fluoreszenzfläche geteilt durch Massenkonzentration der NP (β_{NP}) in ml mg^{-1} . Relative Farbstoffmenge (RFM): eingesetzte Stoffmenge DY (n_{DY}) pro Masse NP (m_{NP}) in $\mu\text{mol g}^{-1}$.

gesetzten Stoffmenge an Farbstoff DY-605 pro Masse der NP, bezeichnet als relative Farbstoffmenge (RFM, n_{DY} pro m_{NP}), von 0,36 über 3,6 bis $18,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ führte zu keiner signifikanten Steigerung der Fluoreszenzintensität. Daraus lässt sich schließen, dass nur eine schwache nicht kovalente Wechselwirkung des Farbstoffs mit den verschiedenen PS-NP auftrat.

Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen sauren und basischen Reaktionsbedingungen für die Immobilisierung von Farbstoff an CA-NP beobachtet,

die keine speziellen reaktiven Gruppen trugen. Die Reaktivität der PS-NP mit aktivierten NHS-Estern war bei leicht saurem pH-Wert niedrig. Im Gegensatz dazu ließ sie sich unter basischen Bedingungen merklich erhöhen. NHS-CAP-NP, die mit dem aminfunktionalisierten Farbstoff bei pH = 8,9 behandelt wurden, zeigten eine intensive Fluoreszenz, insbesondere bei RFM von 3,6 und 18,0 $\mu\text{mol g}^{-1}$ (Abbildung 38b rechts). Die Fluoreszenzflächen stiegen um den Faktor 5 im Vergleich zur Kopplung bei pH = 6,5. Somit lässt sich schlussfolgern, dass der Farbstoff DY-605 kovalent bei pH = 8,9 an NHS-CAP-NP immobilisiert wurde, wohingegen eine nicht kovalente Wechselwirkung bei niedrigerem pH-Wert und nicht reaktiven CA-NP auftrat. Wie bereits erwähnt, können CAP-NP bei pH-Werten über 7 nicht modifiziert werden.

Durch Immobilisierung an der Partikeloberfläche können Farbstoffmoleküle in enger Nähe zueinander fixiert werden, das zu Quenching- oder Verstärkungseffekten führen kann.^[147] Aus diesem Grund war eine direkte Quantifizierung der gebundenen Farbstoffmenge am Partikel durch Vergleich der Fluoreszenzflächen der wässrigen Suspensionen gefärbter Partikel mit einer Farbstofflösung bekannter Konzentration (Kalibration) nicht möglich. Ein indirekter Ansatz wurde genutzt, um den Farbstoffgehalt der NP zu bestimmen. Dafür wurden die getrockneten Partikel in DMSO gelöst, so dass die Farbstoffmoleküle entweder in freier Form bzw. kovalent gebunden an molekular dispersen Polymerketten vorlagen und nicht länger in enger räumlicher Nähe auf einer Oberfläche fixiert waren. Aufgrund der hohen Verdünnung konnten sie sich frei und unbeeinflusst in der Lösung verteilen. Somit konnten Quenching-Effekte in DMSO-Lösungen vernachlässigt werden und es war möglich, die Fläche unter der Fluoreszenzemissionskurve mit einer Farbstoffkonzentration zu korrelieren. Dafür wurde eine Kalibrationskurve des Farbstoffs DY-605 in DMSO aufgenommen. Nachdem die Partikel mit Farbstoff behandelt wurden, wurde ein Teil jeder wässrigen Partikelsuspension lyophilisiert. Der feste Rückstand wurde mit definierter Massenkonzentration (mg ml^{-1}) in DMSO gelöst. Die Fluoreszenzspektren der Lösungen in DMSO wurden nach geeigneter Verdünnung aufgenommen (Abbildung 39a). Die Fluoreszenzspektren der gelösten gefärbten Partikel entsprachen in Gestalt und Emissionsmaximum (631 nm) dem Spektrum des reinen Farbstoffs, gelöst in DMSO (Abbildung 37b). Dieser Ansatz erlaubte die Bestimmung der Farbstoffmenge, die an die verschiedenen Arten der PS-NP gebunden und als relativer Farbstoffgehalt (RFG) bezeichnet wurde.

Der immobilisierte Farbstoffgehalt, quantifiziert durch den indirekten Ansatz in DMSO (Abbildung 39b, Tabelle 13), zeigte qualitativ die gleiche Tendenz wie die zuvor diskutierten RFF, bestimmt in wässrigen Partikelsuspensionen. Bei pH = 6,5 wurden geringe Farbstoffgehalte ($< 1,5 \mu\text{mol g}^{-1}$) für CA-NP und CAP-NP erhalten. NHS-CAP-NP erreichten etwas höhere Werte, was einen ersten Hinweis auf die unterschiedlichen Mechanismen der Immobilisierung (kovalent *vs.* nicht kovalent) liefert. Trotzdem wurden in diesen Fällen lediglich ca. 10 % des eingesetzten Farbstoffs tatsächlich immobilisiert, was für die Immobilisierung teurer Verbindungen wie Wirkstoffe, Farbstoffe, Antikörper und anderer Biomoleküle nicht akzeptabel

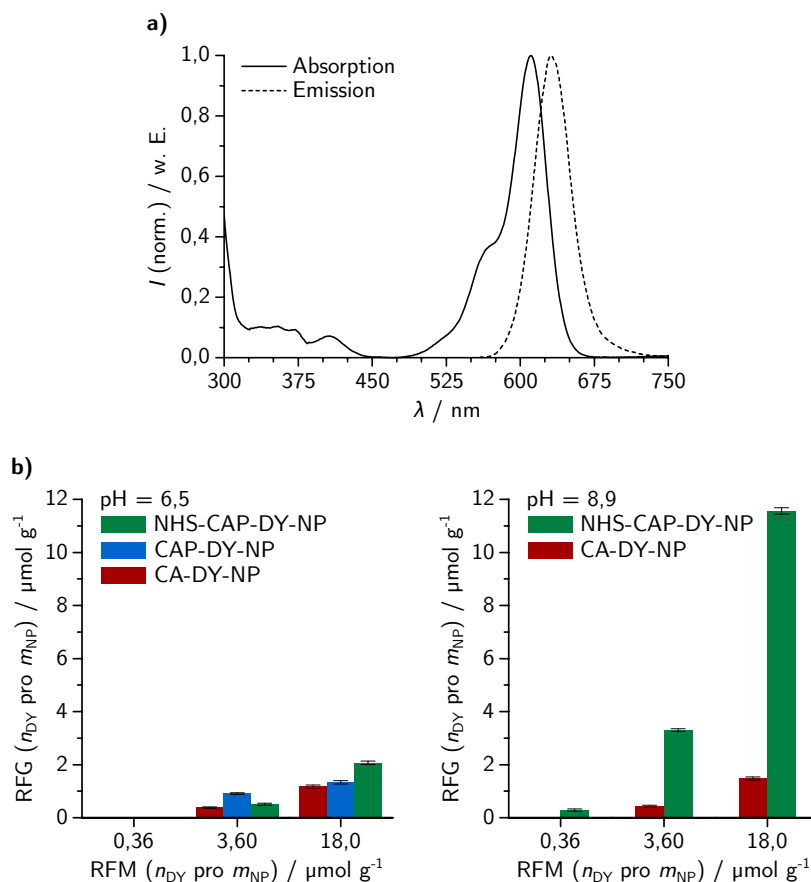


Abbildung 39. a) UV/Vis- und Fluoreszenzemissionsspektren (normalisiert) des Farbstoffs DY-605 (DY) kovalent gebunden an Celluloseacetat-(N-succinimidyl)-phthalat (**NHS-CAP-DY-NP 6**) sowie **b)** relativer Farbstoffgehalt (RFG) der Nanopartikel (NP), hergestellt aus Celluloseacetat (CA), Celluloseacetatphthalat (CAP) und Celluloseacetat-(N-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP) nach der Funktionalisierung mit DY bei einem pH-Wert von 6,5 und 8,9. Die NP wurden lyophilisiert und für die Messung mittels UV/Vis- sowie Fluoreszenzemissionsspektroskopie in Dimethylsulfoxid gelöst. RFG: gebundene Stoffmenge DY (n_{DY}) pro Masse NP (m_{NP}) in $\mu\text{mol g}^{-1}$. Relative Farbstoffmenge (RFM): eingesetzte Stoffmenge DY (n_{DY}) pro Masse NP (m_{NP}) in $\mu\text{mol g}^{-1}$.

ist. Ähnliche Ergebnisse wurden für CA-NP bei pH = 8,9 erzielt.

Mit NHS-CAP-NP wurden bei pH = 8,9 viel höhere Farbstoffgehalte erreicht. Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten konnte bereits ein merklicher Farbstoffgehalt ($0,28 \mu\text{mol g}^{-1}$, **NHS-CAP-DY-NP 4**) für die geringste eingesetzte Farbstoffmenge ($0,36 \mu\text{mol g}^{-1}$) detektiert werden. Der höchste Farbstoffgehalt, der an NP immobilisiert werden konnte, war $11,56 \mu\text{mol g}^{-1}$ (**NHS-CAP-DY-NP 6**) bei einer eingesetzten Farbstoffmenge von $18,0 \mu\text{mol g}^{-1}$. Dies entsprach einer Bindungs-

Tabelle 13. Relativer Farbstoffgehalt (RFG) der reaktiven Nanopartikel (NP) aus Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)-phthalat (NHS-CAP) im Vergleich zu nicht reaktiven NP aus Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetatphthalat (CAP) nach der Behandlung mit Farbstoff DY-605 (DY). Der RFG der NP wurde in Dimethylsulfoxid nach Lyophilisation und Lösen sowie der „scheinbare“ RFG in wässriger Suspension der NP mittels Fluoreszenzmissionsspektroskopie gemessen.

Nr.	Celluloseester	Bedingungen		RFG ^a	
		RFM ^b	pH	$\mu\text{mol g}^{-1}$	
				DMSO	Wasser
NHS-CAP-DY-NP 1	NHS-CAP 7	0,36	6,5	-	0,16 \pm 0,01
NHS-CAP-DY-NP 2	NHS-CAP 7	3,60	6,5	0,51 \pm 0,04	0,51 \pm 0,02
NHS-CAP-DY-NP 3	NHS-CAP 7	18,0	6,5	2,07 \pm 0,06	1,78 \pm 0,04
NHS-CAP-DY-NP 4	NHS-CAP 7	0,36	8,9	0,28 \pm 0,04	0,33 \pm 0,02
NHS-CAP-DY-NP 5	NHS-CAP 7	3,60	8,9	3,30 \pm 0,05	2,44 \pm 0,01
NHS-CAP-DY-NP 6	NHS-CAP 7	18,0	8,9	11,56 \pm 0,12	8,91 \pm 0,25
CA-DY-NP 1	CA	0,36	6,5	-	-
CA-DY-NP 2	CA	3,60	6,5	0,38 \pm 0,03	0,35 \pm 0,01
CA-DY-NP 3	CA	18,0	6,5	1,17 \pm 0,06	1,11 \pm 0,02
CA-DY-NP 4	CA	0,36	8,9	-	-
CA-DY-NP 5	CA	3,60	8,9	0,43 \pm 0,04	0,41 \pm 0,02
CA-DY-NP 6	CA	18,0	8,9	1,48 \pm 0,06	1,31 \pm 0,03
CAP-DY-NP 1	CAP	0,36	6,5	-	0,09 \pm 0,00
CAP-DY-NP 2	CAP	3,60	6,5	0,91 \pm 0,03	0,74 \pm 0,01
CAP-DY-NP 3	CAP	18,0	6,5	1,33 \pm 0,07	1,17 \pm 0,00

^a Relativer Farbstoffgehalt (RFG): gebundene Stoffmenge des Farbstoffs DY-605 (n_{DY}) pro Masse der Nanopartikel (m_{NP}) in $\mu\text{mol g}^{-1}$.

^b Relative Farbstoffmenge (RFM): eingesetzte Stoffmenge des Farbstoffs DY-605 (n_{DY}) pro Masse der Nanopartikel (m_{NP}) in $\mu\text{mol g}^{-1}$, basierend auf Nanopartikeln in wässriger Suspension (ca. $\beta_{\text{NP}} = 2,4 \text{ mg ml}^{-1}$).

effizienz von 64 % gegenüber 12 % bei $\text{pH} = 6,5$ und analogen Bedingungen. Die Bindungseffizienz stieg auf etwa 80 bis 90 % für Versuche mit niedrigeren eingesetzten Farbstoffmengen (**NHS-CAP-DY-NP 4** und **5**). Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Farbstoffimmobilisierung an NHS-CAP-NP bei $\text{pH} = 8,9$ durch kovalente Bindung erzielt wurde. Die Untersuchungen haben die Grundlage für die Kopplung von reaktiven PS-NP mit NHS-Aktivestergruppen gelegt.

Im Fall der Lösung stark gefärbter Partikel (**NHS-CAP-DY-NP 6**) in DMSO erfolgte die Quantifizierung auch mithilfe der UV/Vis-Spektroskopie, entsprechend dem Lambert-Beerschen-Gesetz. Die Konzentration des Farbstoffs wurde mittels Fluoreszenzspektroskopie auf $11,4 \pm 0,1 \mu\text{mol l}^{-1}$ bestimmt und konnte mit UV/Vis-Spektroskopie auf $10,1 \pm 0,0 \mu\text{mol l}^{-1}$ bestätigt werden. Folglich wurden ähnliche Ergebnisse mit beiden Methoden erhalten und die Anwendbarkeit des indirekten Ansatzes verifiziert.

Im Folgenden wurden die erwähnten Quenching-Effekte abgeschätzt, die die direkte Messung der Fluoreszenz wässriger Partikelsuspensionen beeinflussen und so einen Unterschied zu der indirekten Messung der entsprechenden Lösungen in DMSO verursachen. Dafür wurde zusätzlich ein „scheinbarer“ Farbstoffgehalt aus den Fluoreszenzmessungen wässriger Partikelsuspensionen kalkuliert (Tabelle 13). Es wurde eine Kalibration des Farbstoffs DY-605 in Wasser durchgeführt, um die Fluoreszenzflächen in „scheinbare“ Farbstoffgehalte umzurechnen. Bei dieser Vorgehensweise wurden die erwähnten Quenching- oder Verstärkungseffekte, verursacht durch fixierte Farbstoffmoleküle an der Partikeloberfläche, absichtlich ignoriert. Für Partikel mit einem Farbstoffgehalt bis zu etwa $1 \mu\text{mol g}^{-1}$ wurden nur geringe Unterschiede zwischen dem „scheinbaren“ und tatsächlichen Farbstoffgehalt festgestellt, d. h., weder Quenching- noch Verstärkungseffekte traten auf. Allerdings fiel das Fluoreszenzquenching desto ausgeprägter für Partikel mit einem Farbstoffgehalt $> 2 \mu\text{mol g}^{-1}$ aus, je mehr Farbstoff auf der engen Partikeloberfläche immobilisiert war.

6.2.3. Enzymfunktionalisierung reaktiver NHS-Nanopartikel

Die entwickelten reaktiven PS-NP wurden neben Farbstoffen auch mit Proteinen funktionalisiert. Dafür wurden NHS-CAP-NP mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*) bei den optimierten Bedingungen von $\text{pH} = 8,9$ umgesetzt. Die aufgereinigten Konjugate wurden charakterisiert und ihre Enzymaktivität bestimmt (Tabelle 14, Abbildung 40a). Die HRP-Partikel-Konjugate (299 nm, **NHS-CAP-HRP-NP**) wiesen eine leichte Vergrößerung gegenüber den Ausgangspartikeln (243 nm) auf, die vermutlich größtenteils aus der Fixierung des Proteins und der damit gebildeten Proteinhülle resultierte.^[148] HRP besitzt in seiner globulären Form eine Ausdehnung von $4 \times 6,7 \times 11,7 \text{ nm}$ und seine molare Masse beträgt $44\,000 \text{ g mol}^{-1}$.^[148–150] Damit bestätigt die Vergrößerung der Partikel die Anbindung des Proteins an die Partikeloberfläche. Mittels REM konnte gezeigt werden, dass die sphärische Gestalt der NHS-CAP-NP nach Kopplung mit dem Enzym erhalten

Tabelle 14. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP) von Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP), vor und nach der Behandlung mit Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*) in Boratpuffer (pH = 8,9).

Nr.	Celluloseester	Bedingungen		d^a nm	PDI ^a
		RHM ^b $\mu\text{mol g}^{-1}$	pH		
NHS-CAP-NP 2	NHS-CAP 7	-	-	243 ± 3	$0,12 \pm 0,03$
NHS-CAP-HRP-NP	NHS-CAP 7	5,33	8,9	299 ± 2	$0,16 \pm 0,02$
CA-NP 5	CA	-	-	426 ± 12	$0,08 \pm 0,02$
CA-HRP-NP	CA	5,33	8,9	344 ± 5	$0,25 \pm 0,01$

^a Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der NP, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung (DLS).

^b Relative Meerrettichperoxidase (HRP) Menge (RHM): eingesetzte Stoffmenge der HRP (n_{HRP}) pro Masse der Nanopartikel (m_{NP}) in $\mu\text{mol g}^{-1}$, basierend auf Nanopartikeln in wässriger Suspension (ca. $\beta_{\text{NP}} = 2,4 \text{ mg ml}^{-1}$).

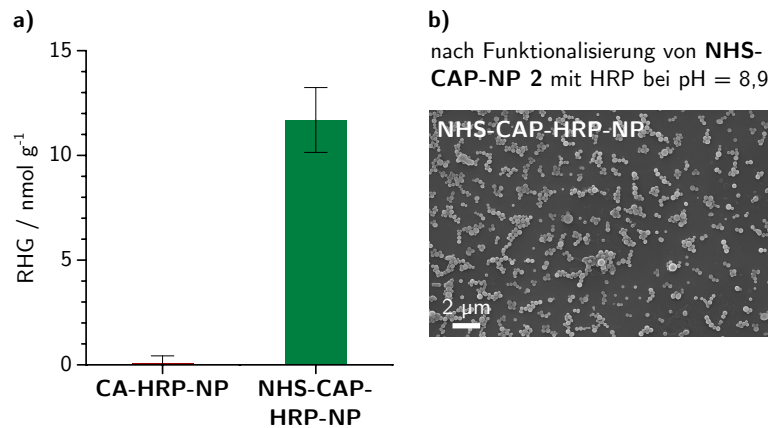


Abbildung 40. a) Enzymaktivität und b) REM-Aufnahmen von Nanopartikeln (NP), hergestellt aus Celluloseacetat (**CA-HRP-NP**) und Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (**NHS-CAP-HRP-NP**), nach der Behandlung mit Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*) in Boratpuffer (pH = 8,9). Relativer Meerrettichperoxidase (HRP) Gehalt (RHG): gebundene Stoffmenge HRP (n_{HRP}) pro Masse NP (m_{NP}) in nmol g^{-1} .

blieb (Abbildung 40b).

Mit dem Enzymassay wurde die Aktivität von HRP durch die Oxidation des Farbstoffs 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin spektroskopisch nach einer in der Literatur etablierten Methode gemessen.^[151] Bei einer relativen Enzymmenge von $5,33 \mu\text{mol g}^{-1}$ wurden an NHS-CAP-NP lediglich $11,7 \text{ nmol g}^{-1}$ Enzym (**NHS-CAP-HRP-NP**) gebunden. Trotzdem war im Vergleich zu nicht reaktiven CA-NP der Gehalt an HRP an NHS-CAP-NP um den Faktor 130 erhöht. Aus diesen Ergebnissen lässt sich in Anlehnung an die Farbstoffimmobilisierung auf eine kovalente Bindung der Aminogruppen des HRP an die Aktivester der NHS-CAP-NP schließen.

Reaktive PS-NP wurden erfolgreich entwickelt. Die Untersuchungen haben die Grundlage für eine effiziente Kopplung von Farbstoffen an diese Partikel gelegt. Das Konzept ist in Zukunft auf andere Moleküle übertragbar. Die Anwendbarkeit für die Enzymimmobilisierung wurde exemplarisch gezeigt, ist aber auch für andere Proteine, Antikörper oder Wirkstoffe denkbar. Dabei erübrigen sich bifunktionelle Linker, die sonst zu diesem Zweck verwendet werden. In Hinsicht auf weitere koppelbare Biomoleküle bieten PS-NP mit aktivierten NHS-Estergruppen großes Potenzial für biomedizinische Anwendungen. Eine weitere Steigerung der Effizienz kann durch Variation der Kopplungsbedingungen (z. B. pH-Wert, Art und Zusammensetzung des Puffers) erreicht werden, muss aber an die jeweiligen Anforderungen eines Moleküls (z. B. an den isoelektrischen Punkt eines bestimmten Proteins) angepasst werden.

7. Reaktive Maleimidderivate des Celluloseacetats

Die Thiol-En-Reaktion stellt neben NHS-Aktivestern des vorangegangenen Kapitels 6 eine vielseitige Methode dar, um Biomoleküle wie Proteine und Antikörper an funktionelle Polymere oder Antikörper zu binden.^[124] Maleimide eignen sich besonders für diesen Zweck, da ihre Click-Reaktion mit Thiolen äußerst schnell und effizient verläuft. Darüber hinaus treten Thiole natürlich als Cystin-Reste in vielen Proteinstrukturen auf und ermöglichen eine Anbindung.^[152] Die Modifizierung von Cellulosenanokristallen und -fasern mit Maleimidgruppen wurde bereits untersucht, um funktionale Materialien herzustellen. Beispielsweise wurden solche Nanokristalle als Vernetzer in Hydrogelen für Bionanokomposite eingesetzt oder ihre Oberfläche mit verschiedenen Polymeren gepfropft.^[153,154] An Nanofasern wurde durch Maleimide Fluoreszenzfarbstoff gebunden oder Naturkautschuk vernetzt.^[155,156] Auch Derivate wie CA wurden mit Maleimiden mittels nukleophiler Substitution von Acetatgruppen funktionalisiert.^[157] Es wurde gezeigt, dass aus CA sphärische NP durch Selbstanordnung in einem kontrollierten Austausch von Lösungsmittel gegen das Fällungsmittel Wasser gebildet werden können (Kapitel 5). Diese unreaktiven PS-NP lassen sich mit hydrophoben Substanzen beladen, bieten jedoch keine weitere Funktion an ihrer Oberfläche. Um CA mit funktionellen Gruppen auszustatten, bietet sich die Veresterung der restlichen Hydroxygruppen an. Auf diese Weise sollte das Konzept gebrauchsfertiger NP, an die gewünschte Moleküle direkt gekoppelt werden können, erweitert werden.

Es sollten *in situ* modifizierbare, reaktive PS-NP entwickelt werden. Dafür sollte erst Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA) aus CA synthetisiert werden. Im Anschluss sollte die Bildung reaktiver NP aus den Derivaten und deren Modifikation mit funktionalen Molekülen (z. B. Farbstoff) untersucht werden.

7.1. Synthese und Charakterisierung

Als Grundlage für die Synthese reaktiver Celluloseester wurde Celluloseacetat gewählt, da es einen hohen Gehalt an hydrophoben Acetatgruppen ($DS_{Ac} = 2,4$) aufweist, die eine Selbstanordnung zu sphärischen NP ermöglichen. Die restlichen Hydroxygruppen stehen für eine Veresterung zur Verfügung. Es wurden drei verschiedene Methoden untersucht, um MAL-CA aus CA herzustellen (Abbildung 41,

Tabelle 15). Dabei sollte der DS-Wert der Maleimidsubstituenten bei der Umsetzung der verfügbaren Hydroxygruppen gezielt gesteuert werden, um keine vollsubstituierten Cellulosederivate ($DS = 3,0$) mit Hinblick auf die spätere Umformung zu NP zu erreichen (siehe Partikelherstellung in Abschnitt 7.3). Für die Veresterung von CA mit 6-Maleimidohexansäure (MHS) kamen übliche Synthesemethoden für PS-Ester zur Anwendung.^[17] Die Carbonsäure wurde mit den Reagenzien DCC, TosCl und Iminiumchlorid *in situ* aktiviert und mit Hydroxygruppen am PS-Rückgrat umgesetzt. Die Reaktionen wurden zunächst für die Umsetzung mit Cellulose untersucht. Dies ermöglicht einen besseren quantitativen Vergleich der verschiedenen Reaktionen, da ein breiterer DS-Bereich von $0 \leq DS_{MAL} \leq 3$ verglichen mit CA ($0 \leq DS_{MAL} \leq 0,6$) zugänglich ist.

Die Steglich-Veresterung wurde genutzt, um Cellulose bzw. CA mit MHS unter Verwendung von DCC/4-PP umzusetzen (Ansatz I in Abbildung 41b, Tabelle 15). DCC aktiviert die Carboxygruppe von MHS und bildet *O*-Acylisoharnstoff als Zwischenstufe.^[17,99] 4-PP überträgt katalytisch die Acylgruppe, indem es den nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe am Carbonylkohlenstoff ermöglicht. Auf diese Weise bildet sich Cellulose-(6-maleimido)hexanoat (MAL-C) bzw. MAL-CA. Zwar war ein zunehmender Stickstoffgehalt bei den Umsetzungen von Cellulose mit erhöhtem Anteil an Reagenz festzustellen, jedoch lösten sich die Produkte (**MAL-C 1** und **2**) in keinem der untersuchten Lösungsmittel. Überraschenderweise wurde ein ähnliches Ergebnis nach der Umsetzung mit CA (**MAL-CA 2**) erhalten, das sich ebenfalls nicht mehr lösen ließ, obwohl CA selbst in den untersuchten Lösungsmitteln löslich war. Vermutlich führte die Anwesenheit von 4-PP während der Reaktion zu einer Vernetzung der Maleimidgruppen. In der Literatur ist die Polymerisation von Maleimiden mit Aminen bekannt.^[158] Der Pyridinstickstoff in 4-PP weist eine hohe Elektronendichte auf, da die Pyrrolidingruppe mit einem +M-Effekt aktivierend auf den Pyridinring wirkt. Damit ist 4-PP vermutlich nukleophil genug, um die elektronenarme Doppelbindung des Maleimids anzugreifen und eine Vernetzung zu initiieren. Ein Verzicht auf den Katalysator senkte jedoch die Reaktivität des Systems ab, sodass es kaum zur Veresterung kam (**MAL-CA 1**). Aus diesem Grund wurde die Aktivierung von MHS mit DCC als ungeeignet erachtet.

In Ansatz II wurde MHS alternativ mit TosCl ohne zugesetzte Base in DMA aktiviert (Abbildung 41b, Tabelle 15). Es entsteht intermediär das gemischte Anhydrid bzw. das Säurechlorid von MHS, die beide mit Hydroxygruppen am Rückgrat den entsprechenden PS-Ester und als Nebenprodukte HCl, *p*-Toluolsulfonsäure sowie regenerierte MHS bilden.^[17,115] Bei den Umsetzungen mit Cellulose und steigendem Anteil an Reagenz wurden Produkte (**MAL-C 3** bis **6**) erhalten, die neben einem erhöhtem Stickstoffgehalt auch einen Restgehalt an Chlor aufwiesen. Die Reaktionsmischungen wurden bei steigendem Reagenzanteil zunehmend geliger und hinderten die Fällung sowie Reinigung der Produkte. Ähnlich zu den Reaktionen mit DCC waren die Produkte wieder komplett unlöslich. Bei den Reaktionen mit TosCl wurde jedoch keine Base eingesetzt, die eine Vernetzung hervorrufen könnte. In diesem Fall

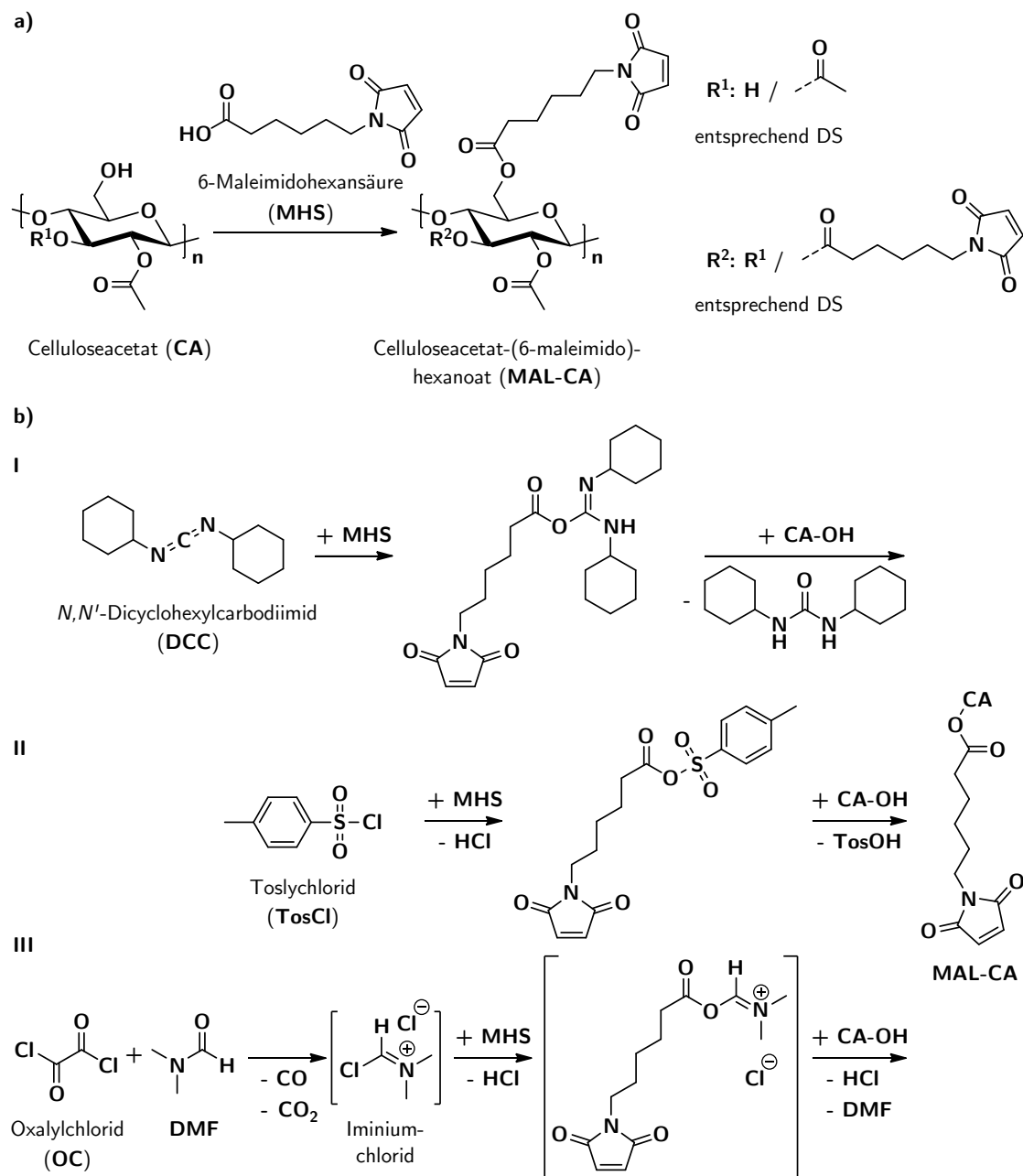


Abbildung 41. a) Reaktionsschema und **b)** Synthesewege zur Gewinnung von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA).

Tabelle 15. Bedingungen und Resultate der Synthese von Cellulose-(6-maleimido)hexanoat und Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA), ausgehend von Cellulose und Celluloseacetat (CA) mit einem durchschnittlichen Substitutionsgrad von 2,4.

Nr.	Bedingungen					DS _{MAL} ^a	DS _{Cl} ^a	Löslichkeit ^b				
	PS ^c	RG ^d	molares Verhältnis ^e PS:RG:MHS	T °C	t h			DMSO	DMA	Aceton	CHCl ₃	THF
MAL-C 1	C	DCC ^f	1:1,50:1,50	60	5	0,28	-	-	-	-	-	
MAL-C 2	C	DCC ^f	1:3,00:3,00	60	5	1,03	-	-	-	-	-	
MAL-C 3	C	TosCl	1:0,50:0,50	60	5	0,27	0,17	-	-	-	-	
MAL-C 4	C	TosCl	1:0,75:0,75	60	5	0,11	0,04	-	-	-	-	
MAL-C 5	C	TosCl	1:1,00:1,00	60	5	1,33	0,93	-	-	-	-	
MAL-C 6	C	TosCl	1:3,00:3,00	60	5	1,73	0,16	-	-	-	-	
MAL-C 7	C	OC	1:2,00:2,00	60	5	1,28	0,05	+	-	-	-	
MAL-CA 1	CA	DCC	1:1,15:1,15	60	20	0,05	-	+	+	+	-	
MAL-CA 2	CA	DCC ^f	1:1,00:1,00	20	20	0,31	-	-	-	-	-	
MAL-CA 3	CA	TosCl	1:2,00:2,00	60	5	0,15	0,02	+	+	+	+	
MAL-CA 4	CA	OC	1:2,00:2,00	60	20	0,31	0,08	+	+	+	+	

^a Durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS), 6-Maleimido)hexanoat (MAL), Desoxychloro (Cl), Acetat (Ac), im Fall der Derivate aus Celluloseacetat: DS_{Ac} = 2,4.

^b Löslichkeit mit 10 mg ml⁻¹ in Dimethylsulfoxid (DMSO), *N,N*-Dimethylacetamid (DMA), Aceton, Chloroform (CHCl₃) oder Tetrahydrofuran (THF); löslich (+), unlöslich (-).

^c Polysaccharid (PS): Cellulose (C), Celluloseacetat (CA).

^d Reagenz (RG): *N,N*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), Tosylchlorid (TosCl), Oxalylchlorid (OC).

^e Molares Verhältnis von Polysaccharid (PS) : Reagenz (RG) : 6-Maleimido)hexansäure (MHS).

^f Unter Zusatz von 0,03 bis 0,8 Äquiv. 4-(1-Pyrrolidinyl)pyridin pro Äquiv. Cellulose bzw. Celluloseacetat.

beruht die Unlöslichkeit der Produkte (**MAL-C 3** bis **6**) wahrscheinlich auf starken Wechselwirkungen der Polymerketten durch Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxygruppen und Carbonylsauerstoff der Imidogruppen.^[159–161] Dementsprechend sollten lösliche Polymere durch modifizierte Hydroxygruppen erhalten werden, wie sie in CA überwiegend vorliegen. Aus diesem Grund wurde MHS mit TosCl aktiviert und mit CA umgesetzt, um ein Produkt (**MAL-CA 3**) mit einem $DS_{MAL} = 0,15$ zu erhalten. Die Maleimidgruppe wurde in CA eingeführt (siehe Charakterisierung weiter unten) und es wurde keine Vernetzung festgestellt. Trotz des Einsatzes von 2 Äquiv. Reagenz und Säure war der erreichte DS gering. Die unvernetzte Struktur von **MAL-CA 3** wurde auch durch die Löslichkeit in allen untersuchten Lösungsmitteln gestützt.

Eine milde Aktivierung der Carboxygruppe von MHS wurde mittels *in situ* erzeugtem Iminiumchlorid durchgeführt, um einerseits eine potenzielle Vernetzung der Maleimide zu verhindern und andererseits den Grad der Funktionalisierung weiter zu erhöhen (Ansatz III in Abbildung 41b, Tabelle 15). Dabei bilden OC und DMF bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ das Iminiumchlorid, das sich mit MHS zum Säureiminiumchlorid umsetzt.^[17,104] Die Reaktionsmischung wurde anschließend zu einer Lösung von CA in DMF bzw. Cellulose in DMA/LiCl gegeben. Durch nukleophilen Angriff der Hydroxygruppe des PS-Rückgrats am aktivierten Carbonylkohlenstoff des Säureiminiumchlorids bildet sich der entsprechende PS-Ester. Während der Reaktion entstehen lediglich gasförmige Nebenprodukte (CO , CO_2 , HCl) und regeneriertes DMF. Die Umsetzung von Cellulose mit Iminiumchlorid ergab ein Produkt mit einem $DS_{MAL} = 1,28$ (**MAL-C 7**) und verlief verhältnismäßig effizient, da von 2 Äquiv. Säure 64 % zu Maleimidsubstituenten umgesetzt wurden. Im Gegensatz zu allen vorherigen Reaktionen an Cellulose, war das erhaltene Produkt in DMSO löslich und die Struktur ohne Vernetzung konnte nachgewiesen werden (siehe Charakterisierung weiter unten). Trotzdem war **MAL-C 7** in den restlichen untersuchten Lösungsmitteln unlöslich. Dieser Befund stützt die Annahme, dass die schlechte Löslichkeit des Produkts wie im Fall von **MAL-C 3** bis **6** durch Wasserstoffbrücken zwischen Hydroxy- und Imidogruppen verursacht wird. Bei der Umsetzung von CA mit Iminiumchlorid wurde das Derivat **MAL-CA 4** in sehr guter Ausbeute gewonnen. Es konnte unter vergleichbaren Reaktionsbedingungen ein doppelt so hoher DS-Wert ($DS_{MAL} = 0,31$) wie mit TosCl (**MAL-CA 3**, $DS_{MAL} = 0,15$) erzielt werden. Das reaktive Säureiminiumchlorid trägt vermutlich zur Erhöhung des DS-Werts bei. Die mit Iminiumchlorid hergestellten Produkte enthielten einen geringen Anteil an Chlor (**MAL-C 7** mit 0,4 % und **MAL-CA 4** mit 0,8 %). Für die Diskussion der Ursache des Chlorgehalts in Form von Säurechloriden bzw. Desoxychlorogruppen sei auf Abschnitt 6.1.1 verwiesen.

Alle löslichen Produkte wurden hinsichtlich ihrer molekularen Struktur mit FT-IR- und NMR-Spektroskopie charakterisiert. Die erfolgreiche Funktionalisierung von CA mit Maleimidgruppen wurde mithilfe von FT-IR-Spektroskopie belegt (Abbildung 42). Das Spektrum von CA zeigte eine charakteristische intensive Bande bei

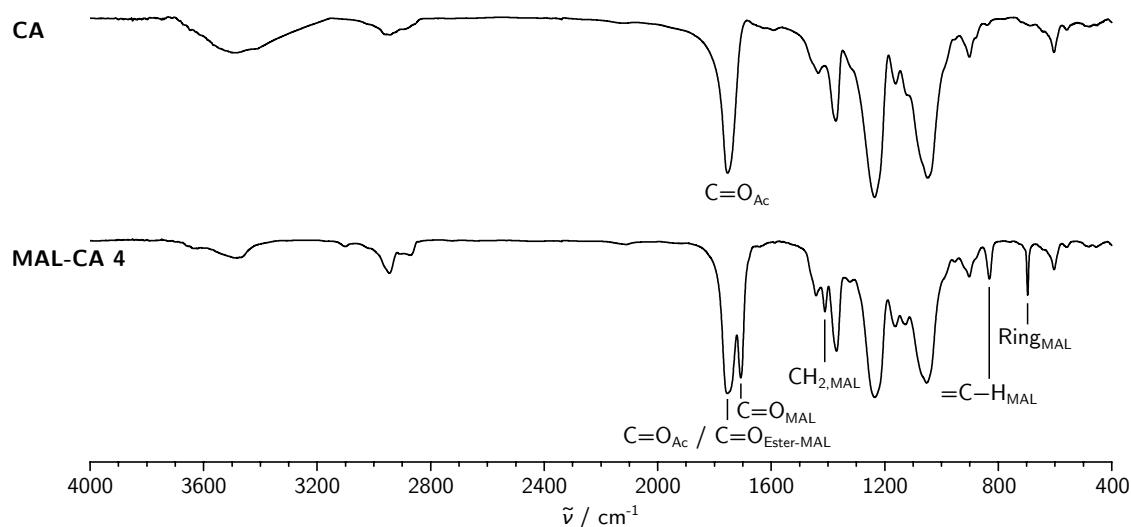


Abbildung 42. FT-IR-Spektren von Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (**MAL-CA 4**).

1754 cm⁻¹ für die Schwingung der Carbonylgruppe des Acetats (C=O_{Ac}). Im Spektrum von **MAL-CA 4** trat eine neue Bande als Schulter bei 1707 cm⁻¹ auf, die der Schwingung beider Carbonylgruppen des Maleimidrings (C=O_{MAL}) zugeordnet werden. Die ebenfalls neu auftretende Bande bei 1411 cm⁻¹ wurde vermutlich durch die Deformationsschwingung der Methylengruppen des Hexanoats (CH_{2,MAL}) verursacht. Bei kleineren Wellenzahlen wurden neue Banden bei 831 cm⁻¹ und 696 cm⁻¹ beobachtet, die der Deformationsschwingung der Methingruppen des Maleimidrings (=C-H_{MAL}) und der Ringschwingung (Ring_{MAL}) zugeordnet werden können.^[162–164]

Das ¹³C-NMR-Spektrum des CA wies die typischen Signale der modifizierten AGE bei ca. 62 ppm (C-6), 71 bis 76 ppm (C-2–5) und 99 bis 102 ppm (C-1 benachbart zu C-2, das mit Acetatgruppen modifiziert ist) auf (Abbildung 43). Es traten Signale bei 20 ppm und im Bereich von 169 bis 170 ppm auf, die der Methyleinheit (C-8) und der Carbonyleinheit (C-7) der Acetatgruppe an den Positionen 2, 3 und 6 der AGE zuzuordnen sind. Im Spektrum der MAL-CA-Derivate erschienen zusätzliche Signale, die die erfolgreiche Veresterung mit MHS bestätigen. Ein charakteristisches Signal bei 134 ppm wird den Methingruppen (C-16) des Maleimids zugewiesen. Darüber hinaus gehören die Signale bei 24 bis 37 ppm zu den Methylengruppen (C-10–14) des Hexanoats. Die Carbonylgruppen des Maleimids (C-15) werden dem intensiveren Signal bei 171 ppm und die des Esters (C-9) dem schwächeren Signal bei 172 ppm zugeordnet.^[162,165]

Die Spektren von MAL-CA wiesen keine nennenswerten Unterschiede in den relativen Intensitäten der Acetatgruppen im Vergleich zu CA auf. Es wurde deshalb davon ausgegangen, dass es zu keiner signifikanten Abspaltung der Acetatgruppen während der Reaktion kam und der DS_{Ac} = 2,4 erhalten blieb. Dies wird durch die

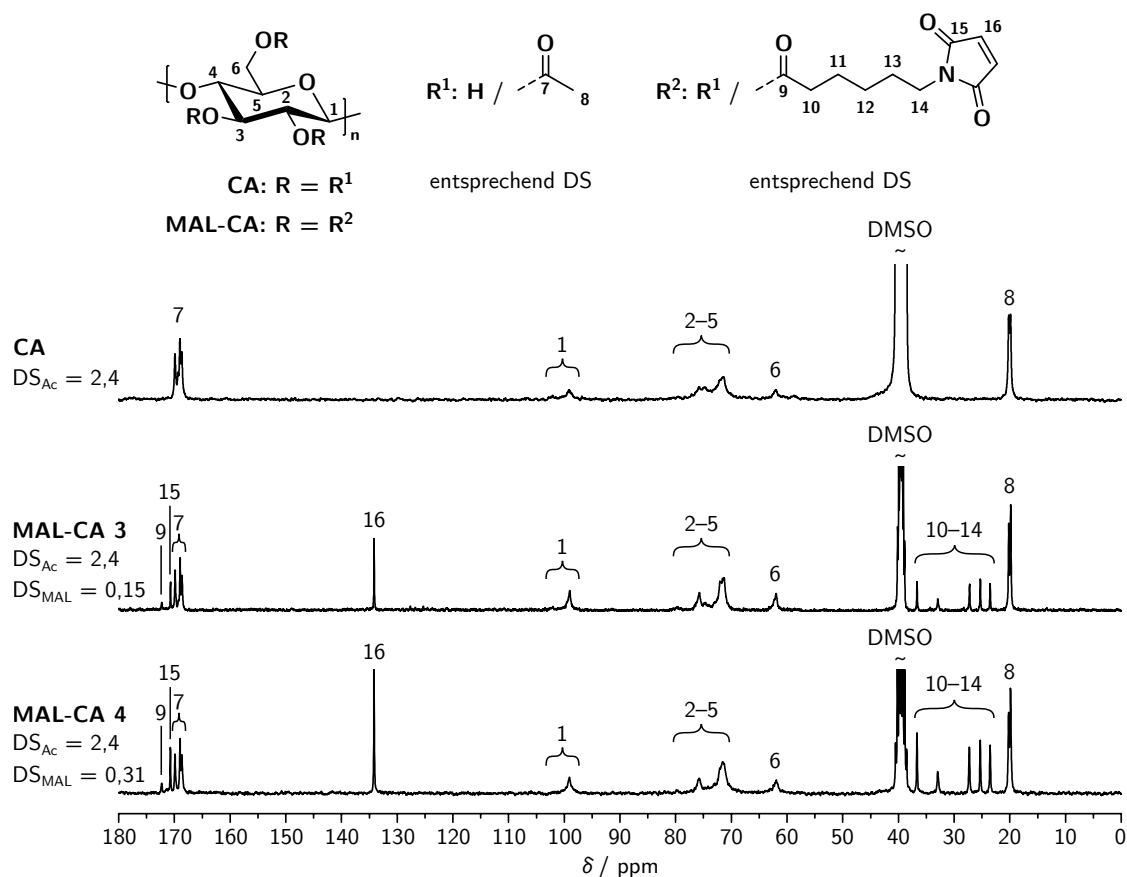


Abbildung 43. ^{13}C -NMR-Spektren von Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA) mit unterschiedlichem durchschnittlichen Substitutionsgrad (DS), aufgenommen in $\text{DMSO}-d_6$.

zuvor beschriebenen Untersuchungen zur Veresterung von CAP gestützt, die unter analogen Reaktionsbedingungen ebenfalls zu keiner Abspaltung von Estergruppen führte (siehe Abschnitt 6.1.1).

Anhand der Ergebnisse wird die Herstellung von MAL-CA mithilfe von Iminiumchlorid als effizienteste unter den untersuchten Methoden erachtet. Für das Produkt **MAL-CA 4** konnte mit definierter molekularer Struktur ein relativ hoher Gehalt an funktionellen Maleimidgruppen erhalten werden. Aus diesem Grund wurde **MAL-CA 4** in weiteren Experimenten zur homogenen Umsetzung mit Thiolen sowie zur Umformung zu reaktiven PS-NP eingesetzt.

7.2. Umsetzung mit Thiolen

Die Thiol-En-Reaktion erfüllt unter anderem mit ihrer hohen Effizienz die Kriterien einer Click-Reaktion.^[166,167] Die Umsetzung von Thiolen mit Alkenen zu Thioethern lässt sich einerseits als radikalische Thiol-En-Reaktion und andererseits als Thiol-Michael-Addition ausführen. Im folgenden Abschnitt liegt der Fokus auf der Thiol-Michael-Addition, die im Allgemeinen eine aktivierte, d. h. elektronenarme Doppelbindung als Reaktionspartner benötigt. Die Reaktion kann entweder durch Basen oder durch Nukleophile katalysiert werden.^[166] Im Reaktionsverlauf erzeugt der Katalysator zuerst durch Deprotonierung das Thiolat-Anion, das dann an der Doppelbindung angreift. Es entsteht ein Carbanion, das entsprechend der elektronenziehenden Gruppe (z. B. in Acrylen oder Maleimiden) als Enolat-Anion vorliegt. Das Carbanion abstrahiert ein Proton von einem weiteren Thiol bzw. vom Katalysator und bildet den Thioether als anti-Markovnikov-Produkt. In der Michael-Addition mit Thiolen gelten Maleimide als sehr reaktive Verbindungen.^[166] Die Ursache dafür liegt in beiden aktivierenden Carbonylgruppen in *cis*-Konformation, die durch ihre elektronenziehende Wirkung ($-M$ -Effekt) eine elektronenarme Doppelbindung bewirken. Zusätzlich besteht eine Ringspannung wegen der gestörten Bindungswinkel. Beide Effekte erzeugen eine stark aktivierte Doppelbindung in Maleimiden, die dafür sorgt, dass die Thiol-Michael-Addition rapide abläuft. Wird die Reaktion mit Maleimiden zudem in sehr polaren Lösungsmitteln (z. B. Wasser, DMSO, DMF) durchgeführt, findet sie auch ohne zugesetzten Katalysator durch spontane Dissoziation des Thiols zum Thiolat-Anion statt.^[166] In diesem Fall liegt eine vom „Lösungsmittel getriebene Reaktion“ vor.

Neben der aktivierten Doppelbindung spielt auch die Art des Thiols eine entscheidende Rolle in der Thiol-Michael-Addition. Je leichter Thiole deprotoniert werden, d. h., je niedriger der pK_S -Wert ist, desto reaktiver sind sie.^[168,169] Aus diesem Grund reagieren Arylthiole ($pK_S \approx 7$) in der Regel leichter als Alkylthiole (pK_S von etwa 10 bis 11). Für die folgenden Umsetzungen wurde ein thiofunktionalisierter Fluoreszenzfarbstoff, das 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC), verwendet.

Die Reaktivität der Maleimidgruppen von MAL-CA gegenüber Thiolen wurde untersucht, indem **MAL-CA 4** ($DS_{MAL} = 0,31$) mit verschiedenen Äquivalenten MMC homogen in DMA umgesetzt wurde (Abbildung 44, Tabelle 16). Bei milden Reaktionsbedingungen von 20 °C und ohne jeglichen Katalysator wurde das Derivat 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl-celluloseacetat (**CUM-CA**) gewonnen. Die eingesetzte Menge an MMC wurde zunehmend in der Reihe 0,50; 0,75 und 1,25 Äquiv. pro Maleimidgruppe erhöht. Die erhaltenen Produkte wiesen einen MS_{CUM} von 0,14 (**CUM-CA 1**); 0,19 (**CUM-CA 2**) und 0,29 (**CUM-CA 3**) auf, das einem umgesetzten Anteil der Maleimidgruppen von 41; 56 bzw. 83 % entsprach. Somit konnte eine effiziente Addition des MMC an die Maleimidgruppen festgestellt werden, die eine gezielte Einstellung des Gehalts eines funktionellen Moleküls am PS-Rückgrat erlaubt. Zusätzlich wurde der Einfluss

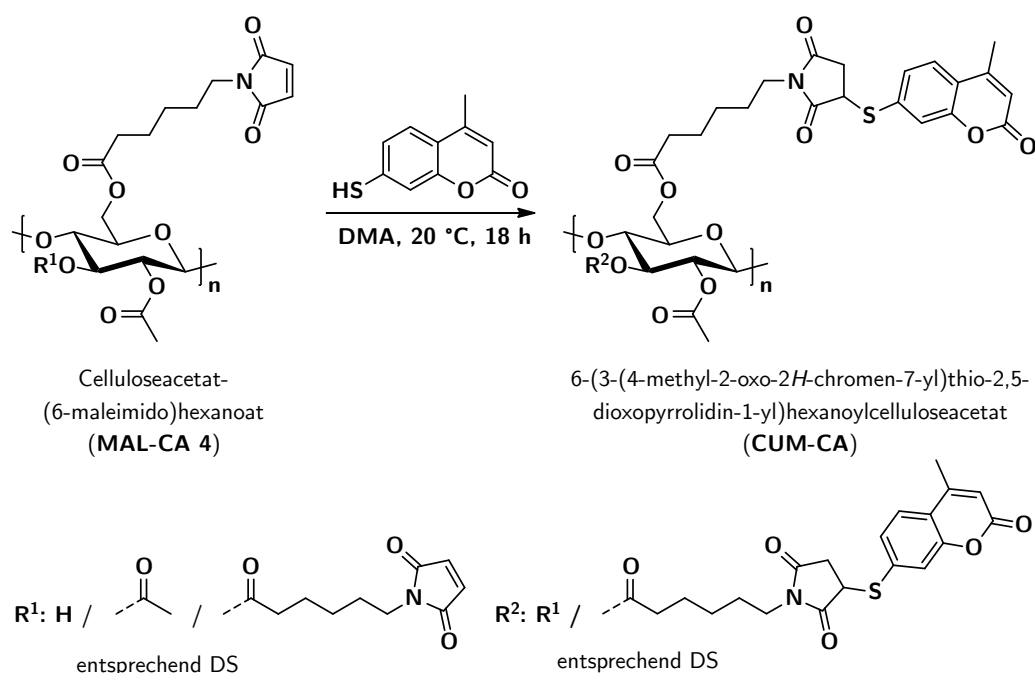


Tabelle 16. Bedingungen und Ergebnisse der Umsetzung zu 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat (CUM-CA), ausgehend von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA 4) und 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC).

Nr. CUM-CA	molares Verhältnis ^a MAL:MMC	MS _{CUM} ^b
1	1:0,50	0,14
2	1:0,75	0,19
3	1:1,25	0,29
4	1:1,25 ^c	0,30

^a Molares Verhältnis von 6-Maleimidohexanoat (MAL) : 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC).

^b Durchschnittlicher molarer Substitutionsgrad (MS), (4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)thio (CUM). Produkte enthalten 6-Maleimidohexanoat (MAL) bzw. 6-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl (DOP) mit der Summe DS_{MAL} + DS_{DOP} im Bereich von 0,34 bis 0,35, Desoxychloro mit einem DS_{Cl} im Bereich von 0,06 bis 0,08 und Acetat mit DS_{Ac} = 2,4. Durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS).

^c Unter Zusatz von 0,16 Äquiv. Pyridin pro Äquiv. 6-Maleimidohexanoat (MAL).

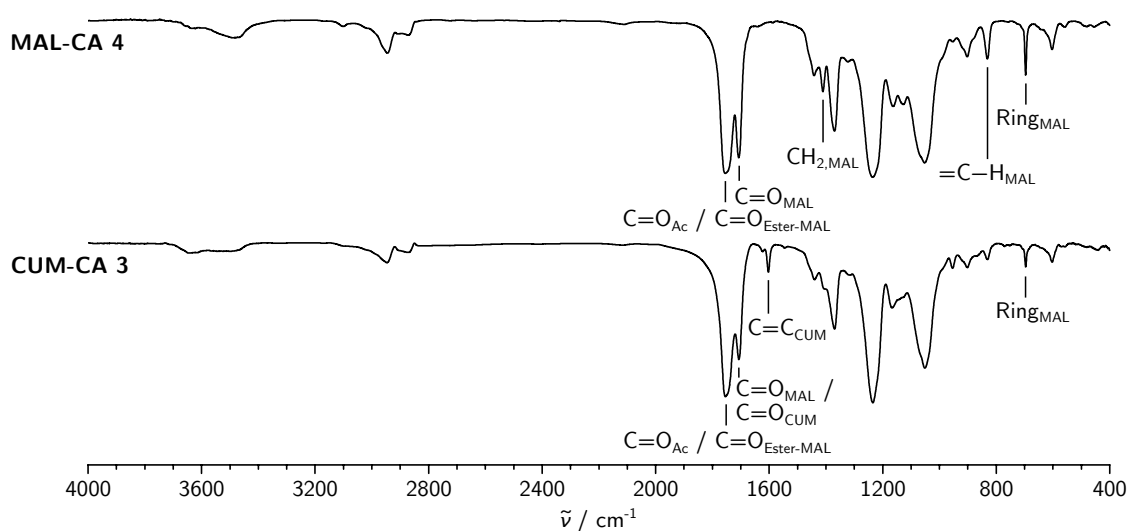


Abbildung 45. FT-IR-Spektren von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA 4) und 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat (CUM-CA 3).

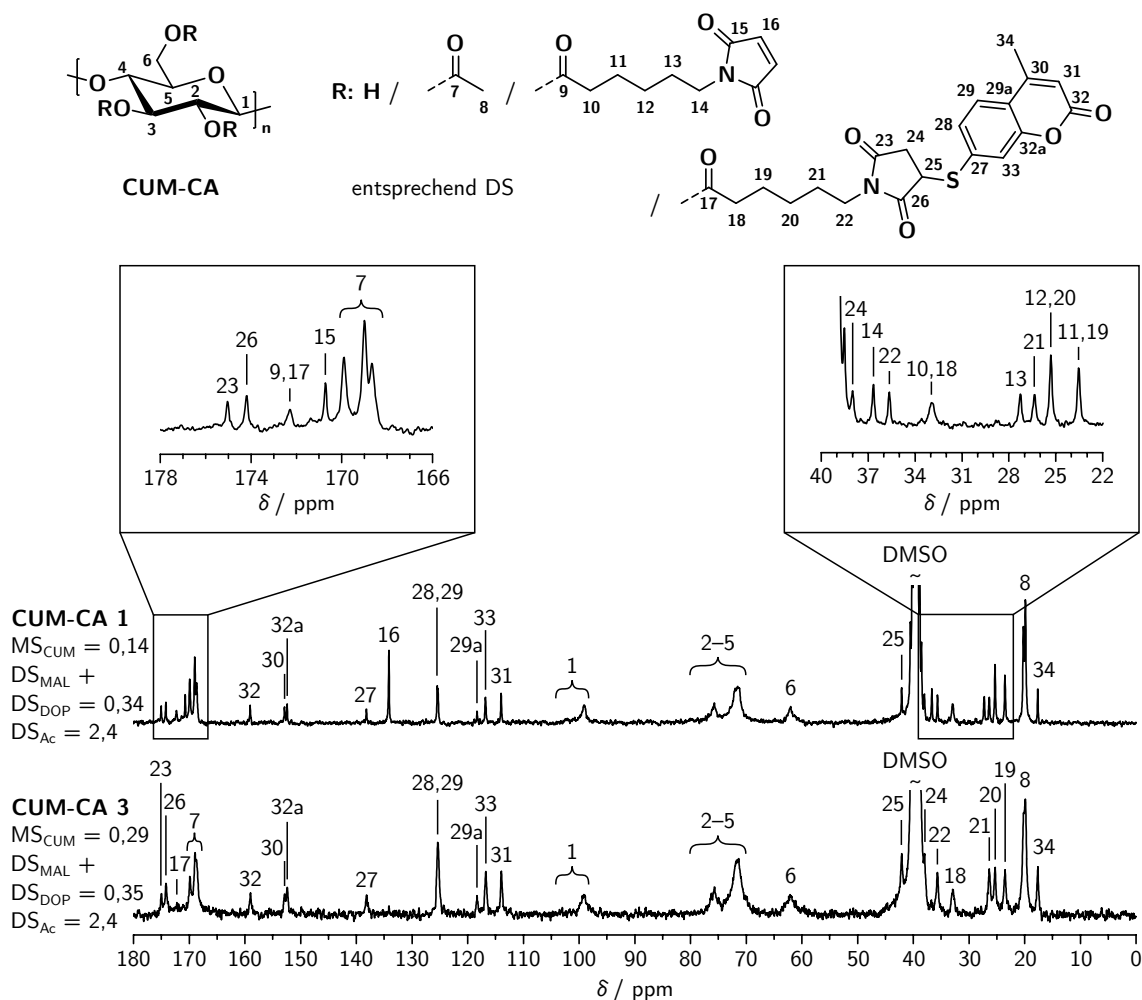


Abbildung 46. ^{13}C -NMR-Spektren von 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)-thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat (**CUM-CA**) mit unterschiedlichem durchschnittlichen molaren Substitutionsgrad (MS), aufgenommen in $\text{DMSO-}d_6$. Durchschnittlicher Substitutionsgrad (DS), (4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)-thio (CUM), Summe aus 6-Maleimidohexanoat (MAL) und 6-(2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoyl (DOP), Acetat (Ac).

bis zum Verschwinden, was die vollständige Umsetzung der Maleimidgruppen anzeigte. Im Gegenzug wurden neue Signale bei 38 ppm und 42 ppm als Schulter des Lösungsmittelsignals beobachtet, die zur Methylengruppe (C-24) und Methingruppe (C-25) des Succinimids gehören. Im restlichen Hochfeld erschien ein zusätzliches Signal bei 18 ppm für die Methylgruppe (C-34) des Cumarins. Im Bereich von 24 bis 37 ppm wurden die Signale für die Methylengruppen (C-18–22) des umgesetzten Hexanoats gefunden, die sich mit denen des nicht umgesetzten Hexanoats (C-10–14) überlappten. Nur die Signale der Methylengruppen (C-21 und C-22) in nächster

Nähe zum Succinimidring bei 26 ppm und 36 ppm waren verschoben zu den Signalen der Methylengruppen (C-13 und C-14) in nächster Nähe des Maleimidrings bei 27 ppm und 37 ppm zu erkennen. Im Bereich von 114 bis 159 ppm wurden Signale beobachtet, die dem Cumaringerüst (C-27–33) zugeordnet werden. Das Signal der beiden Carbonylgruppen (C-15) im symmetrischen Maleimid wurde erneut bei 171 ppm gefunden. Dieses spaltete sich durch Umsetzung der Maleimidgruppe tiefelfeldverschoben in Signale bei 174 ppm und 175 ppm für die Carbonylgruppen (C-26 und C-23) im unsymmetrischen Succinimid auf. Die Carbonylgruppen (C-9 und C-17) der Esterbindungen erschienen zusammen als ein Signal bei 172 ppm. Die Zuordnung aller Signale im ^{13}C -NMR-Spektrum bestätigt die erfolgreiche Anbindung des Mercaptocumarins in den CUM-CA-Derivaten.

Der Vergleich der Fluoreszenzemissionsspektren des freien Cumarinfarbstoffs mit dem Derivat **CUM-CA 3**, in dem der Farbstoff gebunden als Thioether vorliegt, ergab eine ähnliche Form und Lage des Emissionsmaximums bei 399 nm (Abbildung 47). Es wurde jedoch festgestellt, dass die Fluoreszenzintensität des niedrig konzentrierten, gebundenen Cumarinfarbstoffs ($c_{\text{CUM-CA 3}} \leq 31,0 \mu\text{mol l}^{-1}$) um einiges stärker ausfiel, als die des freien Farbstoffmoleküls trotz höherer Konzentration ($c_{\text{MMC}} \geq 53,6 \mu\text{mol l}^{-1}$). Die Ursache dafür ist, dass das Mercaptocumarin im Gleichgewicht mit seiner tautomeren Thionform steht.^[172] Das Thion ermöglicht eine effiziente strahlungsfreie Deaktivierung und verringert so die Quantenausbeute. Durch Alkylierung der Thiolgruppe, wie im Derivat **CUM-CA 3**, wird die tautomere Umwandlung in das Thion verhindert und die Quantenausbeute erhöht.

Die Ergebnisse der Synthese von CUM-CA-Derivaten zeigen, dass funktionelle Moleküle mit Thiolgruppen schnell und effizient am PS-Rückgrat von MAL-CA mit präzise einstellbarem MS gebunden werden können. Damit bietet die Thiol-Michael-

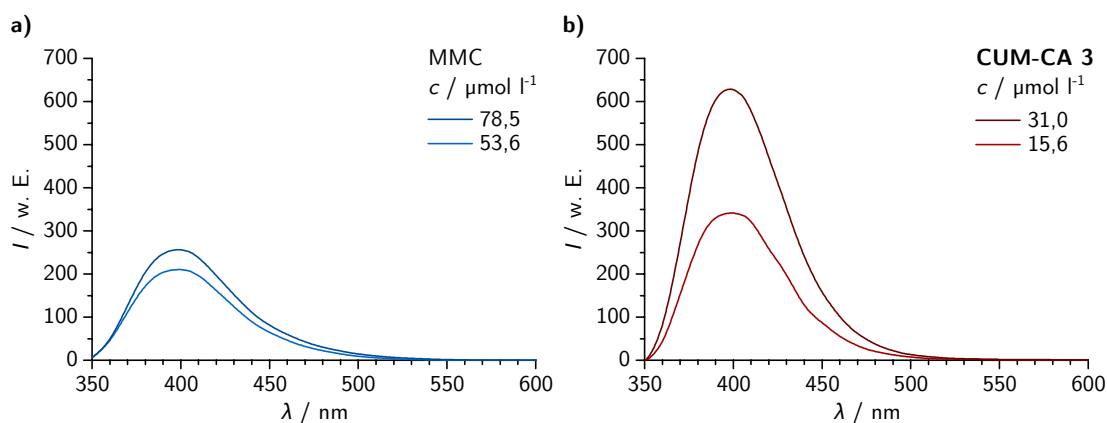


Abbildung 47. Fluoreszenzemissionsspektren von **a)** 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC) und **b)** 6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat (**CUM-CA 3**), gemessen in DMSO mit unterschiedlichen Konzentrationen (c).

Addition an MAL-CA Voraussetzungen, um für funktionale, SH-reaktive NP genutzt zu werden.

7.3. Bildung und *in situ*-Funktionalisierung von SH-reaktiven Nanopartikeln

Aus den hydrophoben MAL-CA-Derivaten mit modifizierbaren Maleimidgruppen wurden reaktive PS-NP hergestellt. Für die folgenden Experimente wurde das Derivat **MAL-CA 4** verwendet, da es den höchsten Grad an Funktionalisierung mit Maleimidgruppen ($DS_{MAL} = 0,31$, $DS_{AC} = 2,4$) aufwies. Die verbliebenen Hydroxygruppen am PS-Rückgrat sind essentiell für die Selbstanordnung des PS zu sphärischen NP, da in der Literatur Aggregation anstelle von Partikelbildung für vollsubstituierte Celluloseacetate beschrieben wurde.^[43]

Mittels Dialyse wurden annähernd sphärische NP aus **MAL-CA 4** hergestellt (Abbildung 48). Aus dem Derivat ließen sich abhängig von der Polymerkonzentration Partikel mit einem Durchmesser von ungefähr 200 bis 300 nm und schmaler Verteilung von $PDI < 0,1$ formen (Tabelle 17, **MAL-CA-NP 1–4**). Eine stetige Zunahme des Partikeldurchmessers mit steigender Konzentration des **MAL-CA 4** konnte beobachtet werden. Die Eigenschaften der MAL-CA-NP folgen damit den Mechanismen während der Selbstanordnung (Nukleation und Wachstum, Nukleation und Aggregation, siehe Abschnitt 2.1).^[42] Partikel aus CAP und NHS-CAP zeigten bereits ein ähnliches Verhalten (siehe Abschnitte 5.1.1 und 6.2.1). Im Gegensatz zu CA-NP (Durchmesser etwa 300 bis 400 nm) fielen MAL-CA-NP kleiner aus, was vermutlich auf die stärkere Hydrophobierung des Polymers durch die zusätzlichen Maleimidgruppen zurückzuführen ist.

Es wurde untersucht, wie stabil die Maleimidgruppen der reaktiven PS-NP gegenüber einer möglichen Hydrolyse während Dialyse und Lagerung der wässrigen Partikelsuspensionen sind. Die Suspension **MAL-CA-NP 2** wurde hierzu im Anschluss an die Dialyse lyophilisiert und der erhaltene Feststoff in gelöster Form mittels NMR-

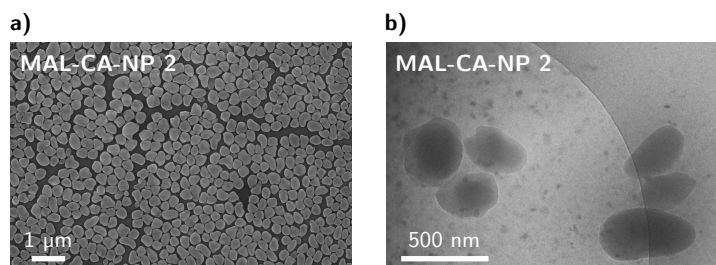


Abbildung 48. a) REM- und b) Kryo-TEM-Aufnahmen von Nanopartikeln, hergestellt aus Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (**MAL-CA-NP 2**).

Tabelle 17. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP), hergestellt aus Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (**MAL-CA 4**) mittels Dialyse.

Nr. MAL-CA-NP	$\beta_{\text{MAL-CA 4}}^a$ mg ml ⁻¹	d^b nm	PDI ^b
1	2	211 ± 1	0,05 ± 0,02
2	4	236 ± 2	0,05 ± 0,03
3	6	296 ± 4	0,06 ± 0,01
4	8	313 ± 2	0,09 ± 0,01

^a Massenkonzentration von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat ($\beta_{\text{MAL-CA 4}}$) in einer Lösung in *N,N*-Dimethylacetamid (DMA) vor der Dialyse.

^b Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der Nanopartikel (NP), bestimmt durch dynamische Lichtstreuung (DLS).

Spektroskopie untersucht (Abbildung 49). Das ¹³C-Spektrum der lyophilisierten Partikel **MAL-CA-NP 2** war identisch mit dem des Ausgangsderivats **MAL-CA 4**. Dies konnte auch mittels Elementaranalyse bestätigt werden, da sich der Gehalt der Maleimidgruppen des Derivats (**MAL-CA 4**, DS_{MAL} = 0,31) gegenüber den lyophilisierten Partikeln (**MAL-CA-NP 2**, DS_{MAL} = 0,30) nicht änderte. Bei der Bildung und Lagerung der NP aus MAL-CA bleibt die molekulare Struktur des Derivats somit erhalten und steht für die weitere Funktionalisierung in der wässrigen Phase zur Verfügung.

Aus den MAL-CA-Derivaten wurden reaktive PS-NP hergestellt, die *in situ* funktionalisiert wurden. Dafür wurden das Derivat **MAL-CA 4** und MMC gemeinsam bei verschiedenen Verhältnissen der Maleimidgruppe zu Mercaptocumarin in DMA gelöst und geschüttelt. In der Lösung vollzog sich die homogene Reaktion von Thiol und Maleimid zum Thioether auf effiziente Weise, wie bereits im obigen Abschnitt 7.2 beschrieben wurde. Im Anschluss wurden die Lösungen sofort gegen Wasser dialysiert, um gleichzeitig reaktive und fluoreszente NP (CUM-CA-NP) zu erhalten, deren Partikelgrößen (Tabelle 18) bestimmt wurden. Diese Vorgehensweise der vorhergehenden Mischung von funktionalem Molekül und MAL-CA-Derivat mit sofort einsetzender Reaktion sowie anschließender Umformung zu NP wird als *in situ*-Funktionalisierung reaktiver PS-NP bezeichnet. Dabei wurde gezielt ein Unterschuss an Mercaptocumarin eingesetzt, um teilweise cumarinmodifizierte Partikel mit überschüssigen reaktiven Gruppen zu erhalten, die eine weitere Anbindung von funktionalen Molekülen (z. B. Proteine) im wässrigen Medium erlauben. Das Cumarin wurde genutzt, um die *in situ*-Funktionalisierung der reaktiven PS-NP zu untersuchen.

Die Durchmesser der CUM-CA-NP waren abhängig von der eingesetzten Menge des Mercaptofarbstoffs (Tabelle 18). Bei niedriger Polymerkonzentration (2 mg ml⁻¹)

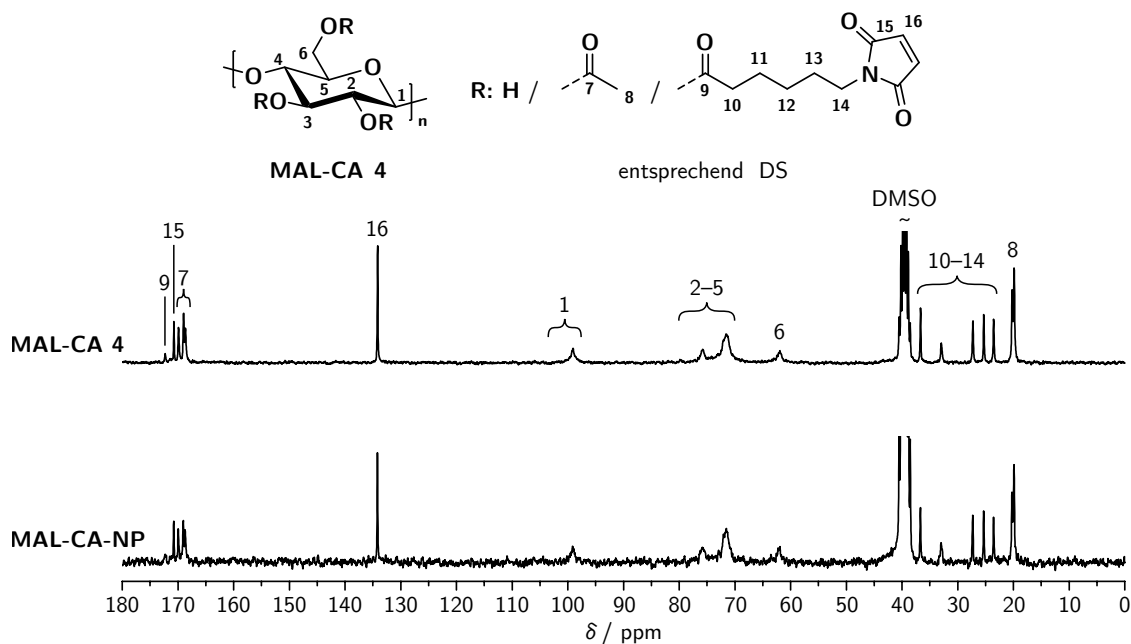


Abbildung 49. ^{13}C -NMR-Spektren des Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA 4) vor und nach der Partikelbildung, aufgenommen in $\text{DMSO}-d_6$.

Tabelle 18. Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) von Nanopartikeln (NP), hergestellt durch *in situ*-Funktionalisierung von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA 4) mit 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC) und anschließender Dialyse.

Nr.	Bedingungen		d^a nm	PDI ^a
	$\beta_{\text{MAL-CA 4}}^b$ mg ml^{-1}	molares Verhältnis ^c MAL:MMC		
1	2	1:0,25	244 ± 1	$0,09 \pm 0,02$
2	2	1:0,50	290 ± 6	$0,16 \pm 0,01$
3	2	1:1,00	338 ± 2	$0,17 \pm 0,02$
4	4	1:0,25	400 ± 6	$0,13 \pm 0,02$
5	4	1:0,50	469 ± 1	$0,13 \pm 0,02$
6	4	1:1,00	551 ± 13	$0,15 \pm 0,03$

^a Durchschnittlicher (*Z-Average*) Durchmesser (d) und Polydispersitätsindex (PDI) der NP, bestimmt durch dynamische Lichtstreuung (DLS).

^b Massenkonzentration von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat ($\beta_{\text{MAL-CA 4}}$) in einer Lösung in *N,N*-Dimethylacetamid (DMA) vor der Dialyse.

^c Molares Verhältnis von 6-Maleimidohexanoat (MAL) : 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC).

und zunehmendem Farbstoffgehalt vergrößerten sich die Partikel (**CUM-CA-NP 1, 2 und 3**) auf etwa 240 bis 340 nm im Vergleich zu ungefärbten Partikeln (**MAL-CA-NP 1**, 211 nm). Noch deutlicher fiel die Vergrößerung bei höherer Polymerkonzentration (4 mg ml^{-1}) aus. Der Durchmesser ungefärbter Partikel (**MAL-CA-NP 2**) nahm von 236 nm auf etwa 400 bis 550 nm (**CUM-CA-NP 4, 5 und 6**) mit steigendem Farbstoffgehalt zu. Die Ursache dafür liegt vermutlich in verlängerten hydrophoben Gruppen, die durch kovalente Bindung hydrophober Cumarinmoleküle an Maleimidgruppen im Abstand zum PS-Rückgrat entstehen. Die sterisch anspruchsvollen hydrophoben Gruppen erschweren die Selbstanordnung der Polymerketten zu kompakteren NP. Trotzdem zeigten CUM-CA-NP ebenfalls eine annähernd sphärische Form, die vergleichbar zu ungefärbten MAL-CA-NP war (Abbildung 50).

Im Folgenden wurden die spektroskopischen Eigenschaften der cumarinmodifizierten Partikel untersucht. UV/Vis-Spektren der wässrigen Suspensionen von CUM-CA-NP wurden mithilfe einer Ulbricht-Kugel aufgenommen (Abbildung 51a). Damit lässt sich das komplette transmittierte Licht der Suspensionen einschließlich der gestreuten Anteile detektieren, um genäherte Absorptionsspektren zu erhalten.^[173] Das Absorptionsmaximum des als Thioether gebundenen Cumarinfarbstoffs wurde bei 326 bis 331 nm beobachtet. Dies entspricht dem Literaturwert des Absorptionsmaximums von methylsubstituiertem MMC (333 nm) in vergleichbar protischen Lösungsmitteln wie Methanol.^[172] Über diese qualitative Feststellung hinaus ergab sich, dass bei gleicher Massenkonzentration von MAL-CA die Absorption mit steigender eingesetzter Cumarinmenge zunimmt. Gleichzeitig zeigte sich jedoch auch, dass die gemessene Absorption von der Größe der Partikel abhängt. So wiesen **CUM-CA-NP 2 und 4** trotz gleicher eingesetzter Cumarinmenge unterschiedliche Absorptionswerte auf. Dies traf ebenfalls auf **CUM-CA-NP 3 und 5** zu. Es muss bei dieser Messung beachtet werden, dass Effekte wie eine Verstärkung durch nochmalige Absorption des reflektierten Lichts oder generell unterschiedliche effektive Weglängen des Lichts bei der Proben- und Referenzmessung auftreten.^[174,175] Deshalb wurden genäherte Absorptionsspektren erhalten, die von der tatsächlichen Absorption abweichen und nur eine semiquantitative Betrachtung erlauben.

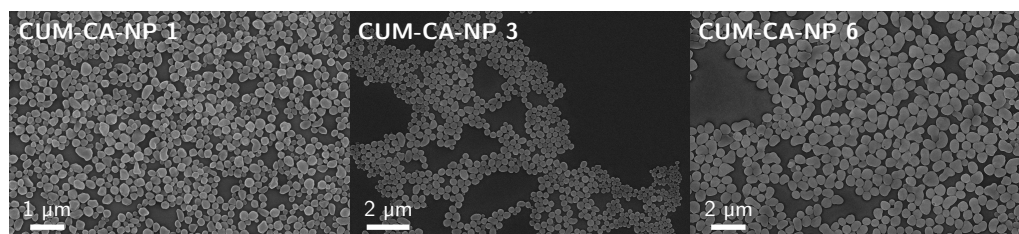


Abbildung 50. REM-Aufnahmen von Nanopartikeln, hergestellt durch *in situ*-Funktionalisierung von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (**MAL-CA 4**) mit 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC) und anschließender Dialyse.

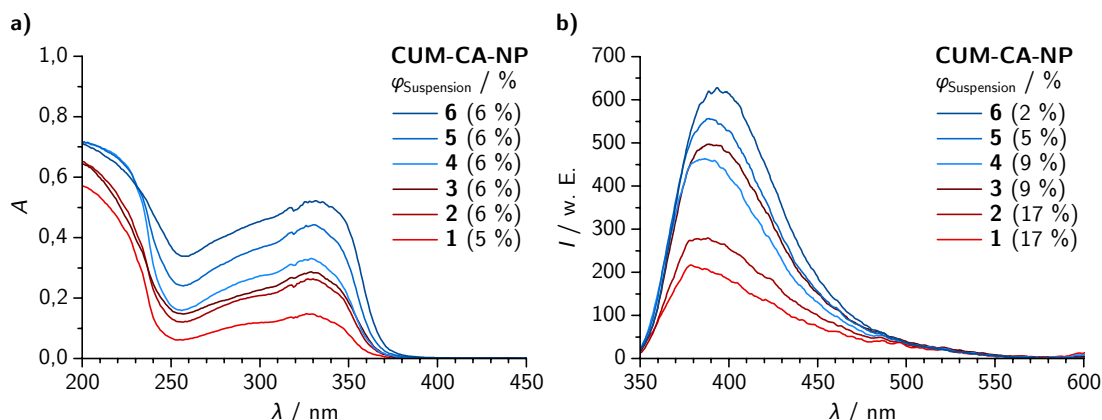


Abbildung 51. a) UV/Vis-Spektren (mittels Ulbricht-Kugel) und **b)** Fluoreszenzemissionsspektren der wässrigen Suspensionen von Nanopartikeln (NP), hergestellt durch *in situ*-Funktionalisierung von Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (**MAL-CA 4**) mit 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC) und anschließender Dialyse. Die gewonnenen Suspensionen wurden vor der Messung auf die entsprechenden Volumenanteile ($\varphi_{\text{Suspension}}$) verdünnt.

Es wurden Fluoreszenzspektren der wässrigen Suspensionen von CUM-CA-NP aufgenommen, um qualitative Informationen über den gebundenen Cumarinfarbstoff zu gewinnen (Abbildung 51b). Das Fluoreszenzmaximum bei niedrigem Farbstoffgehalt (**CUM-CA-NP 1**) wurde bei 379 nm beobachtet und verschob sich bathochrom bis zu 394 nm bei hohem Farbstoffgehalt (**CUM-CA-NP 6**). Die bathochrome Verschiebung hat ihre Ursache vermutlich darin, dass bei höherem Farbstoffgehalt mehr Cumarinmoleküle mit dem umgebenden Wasser an der Partikeloberfläche wechselwirken können. Der angeregte Zustand von Cumarinen wird in protischen Lösungsmitteln durch Wasserstoffbrücken mit dem Carbonylsauerstoff besser stabilisiert und sinkt energetisch ab.^[172] In diesem Zusammenhang lässt sich auch erklären, dass die Verschiebung der Fluoreszenzmaxima (379 bis 394 nm) von CUM-CA-NP stärker ausfällt als die der Absorptionsmaxima (326 bis 331 nm). Die $\pi^* \rightarrow \pi$ Fluoreszenz ist empfindlicher gegenüber Wasserstoffbrücken als die $\pi \rightarrow \pi^*$ Absorption.^[172] Eine genaue Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten wird durch auftretende Streuung der fluoreszenten Partikel während der Messung erschwert.^[173] Außerdem können Farbstoffmoleküle, die in räumlicher Nähe zueinander im Partikel oder an der Partikeloberfläche fixiert sind, Quenching-Effekte zeigen (siehe Abschnitt 6.2.2). Dennoch lässt sich semiquantitativ festhalten, dass sich die Fluoreszenzintensitäten von CUM-CA-NP mit steigendem Farbstoffgehalt erwartungsgemäß erhöhen.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass sich das Konzept reaktiver PS-NP erfolgreich erweitern ließ. Die SH-reaktiven NP bieten den Vorteil, in einem Schritt bereits modifizierte Partikel durch *in situ*-Funktionalisierung zu erhalten. Der Überschuss an dem Fluoreszenzfarbstoff Mercaptocumarin wurde gezielt eingesetzt, damit nach er-

folgt der Partikelbildung Maleimidgruppen an der Oberfläche für die weitere kovalente Anbindung von thioltragenden Molekülen zur Verfügung stehen. Die entwickelten CUM-CA-NP bieten somit großes Potenzial als Sensoren in der Bioanalytik.

8. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neuartige Polysaccharidnanopartikel (PS-NP) entwickelt und hinsichtlich ihrer Anwendung im Bereich von *Lateral Flow Immunoassay* (LFA) untersucht. Drei verschiedene Konzepte zur Herstellung der Nanomaterialien wurden erarbeitet: (I) Einlagerung von Farbstoffen in PS-NP, die an der Oberfläche über Carboxygruppen zur Kopplung von Antikörpern verfügen, (II) direkte kovalente Bindung von Farbstoff und Enzym durch reaktive Gruppen an der Oberfläche von PS-NP und (III) direkte kovalente Anbindung von Farbstoff an reaktive PS-Derivate im Verlauf des Partikelbildungsprozesses.

Es konnten erstmals hydrophobe Farbstoffe in eine PS-NP-Matrix eingeschlossen werden. Dies wurde durch Selbstanordnung hydrophober Celluloseester, Celluloseacetat (CA) und Celluloseacetatphthalat (CAP), in Gegenwart der Farbstoffe erreicht. Die Partikeleigenschaften der Komposit-NP werden sowohl durch die Hydrophobie der Farbstoffe als auch durch sekundäre Wechselwirkung wie Wasserstoffbrücken zwischen Farbstoff und Celluloseestermatrix beeinflusst. Im Vergleich beider Herstellungsverfahren – Dialyse und Eintropfen – konnten Partikelgröße und Breite der Größenverteilung optimiert werden, um kleine und einheitliche Komposit-NP zu erhalten. Mittels UV/Vis-spektroskopischer Messungen und Kryo-TEM-Experimenten wurde festgestellt, dass vor allem stark hydrophobe Farbstoffe nicht gleichmäßig, sondern graduell verteilt in den Komposit-NP vorliegen. Dieser Befund ist für die Einlagerung anderer aktiver Substanzen wie Wirkstoffe in PS-basierten Nanomaterialien von Bedeutung. Durch Aktivierung der Carboxygruppen an der Oberfläche war es möglich, CAP-basierte Komposit-NP mit Antikörpern gegen humanes C-reaktives Protein kovalent zu koppeln. Die erhaltenen gefärbten Konjugate eigneten sich für die Anwendung als Marker im LFA und zeigten eine verbesserte Leistungsfähigkeit gegenüber dem Stand der Technik (Gold-NP).

Mithilfe verschiedener Synthesemethoden unter homogenen Bedingungen konnten maßgeschneiderte Cellulosederivate mit Aktivestergruppen basierend auf *N*-Hydroxysuccinimid (NHS) hergestellt werden. Die Umsetzung von CAP mit *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat stellte sich dabei als besonders effektiver Ansatz heraus. Durch Ausnutzung der Selbstassoziationsneigung dieser Derivate wurden erstmals reaktive PS-NP mit aktivierten NHS-Gruppen erhalten, an die sich aminfunktionalisierte Verbindungen wie Farbstoffe oder Enzyme direkt und ohne den sonst üblichen Aktivierungsschritt in wässriger Phase kovalent immobilisieren ließen. Fluoreszenzmessungen ergaben, dass der Farbstoff unter optimierten Reaktionsbedingungen (Farbstoffmenge, basischer pH-Wert) mit hoher Effizienz von bis zu 90 % gebunden wird.

Es wurden neue PS-NP mit reaktiven Maleimidgruppen entwickelt. Für die homogene Umsetzung von 6-Maleimidohexansäure mit CA erwies sich die Aktivierung der Carboxygruppe mit Iminiumchlorid als effektivste Methode. In homogenen Reaktionen wurde Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (MAL-CA) mit thioolfunktionalisiertem Farbstoff derivatisiert und der MS des Farbstoffs konnte dabei gezielt eingestellt werden. Aufgrund des hohen Gehalts an Acetatgruppen ließen sich die hydrophoben MAL-CA zu annähernd sphärischen NP umformen. Beide Eigenschaften der MAL-CA wurden zu *in situ* funktionalisierten reaktiven PS-NP zusammengeführt. In einem Schritt wurden dafür Thiolfarbstoff und MAL-CA gemeinsam gelöst, umgesetzt und anschließend zu fluoreszenten, reaktiven NP umgeformt.

Die entwickelten PS-NP besitzen aufgrund ihrer funktionalen Eigenschaften großes Potenzial in der biomedizinischen Anwendung. Es können weitere Testsysteme mit klinischer Relevanz etabliert werden, indem andere Antikörper an den Komposit-NP gebunden werden. Sensitivität und dynamischer Arbeitsbereich des LFA lassen sich durch Einschluss anderer Farbstoffe einstellen. Neben der Verwendung als Biosensoren können Komposit-NP, die aus biokompatiblen PS bestehen, durch Einschluss von Wirkstoffen auch im Bereich des *Drug Delivery* genutzt werden. Die reaktiven PS-NP erübrigen bifunktionelle Linker, die üblicherweise für die Immobilisierung von Biomolekülen wie Antikörpern eingesetzt werden. Im Fall der NHS-aktivierten NP ist die Optimierung der Kopplungsbedingungen (vor allem pH-Wert) abhängig vom entsprechenden Substrat ein wichtiges Kriterium.

Teil III.

Experimenteller Teil

Materialien

Mikrokristalline Cellulose (Avicel® PH-101; $DP_v = 135$; viskosimetrisch bestimmt entsprechend der Literatur)^[176] wurde von Fluka (Neu-Ulm, Deutschland) erworben. Celluloseacetat (CA; $DS_{Ac} = 2,3$; bestimmt durch Perpropionylierung und 1H -NMR-Spektroskopie entsprechend der Literatur;^[177] $M_n = 59\,500\text{ g mol}^{-1}$ und $M_w = 137\,900\text{ g mol}^{-1}$; bestimmt durch SEC) wurde für Experimente in Kapitel 5 genutzt und über Eastman Chemical (Kingsport, TN, US) bezogen. CA ($DS_{Ac} = 2,4$; bestimmt durch Perpropionylierung und 1H -NMR-Spektroskopie) wurde für Experimente in Kapitel 6 sowie 7 verwendet und ebenfalls von Eastman Chemical erworben. Celluloseacetatphthalat (CAP; $DS_{Ac} = 1,8$ und $DS_{Ph} = 0,7$; bestimmt durch quantitative ^{13}C -NMR-Spektroskopie; $M_n = 29\,900\text{ g mol}^{-1}$ und $M_w = 63\,600\text{ g mol}^{-1}$; bestimmt durch SEC) wurde für Experimente in Kapitel 5 genutzt und in protonierter Form über Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. CAP ($DS_{Ac} = 1,98$ und $DS_{Ph} = 0,69$; bestimmt durch 1H -NMR-Spektroskopie in DMSO- d_6 nach Zusatz von Trifluoressigsäure, um Signale der Hydroxygruppen und des Wassers zu verschieben) wurde für Experimente in Kapitel 6 verwendet und ebenfalls in protonierter Form von Sigma-Aldrich erhalten.

2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR; *solvent red 24*, C.I. 26105), Sudan-schwarz B (SB; *solvent black 3*, C.I. 26150) und 4-Chlorbenzylamin (97 %) wurden von Alfa Aesar (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Aminfunktionalisierter Farbstoff DY-605 wurde freundlicherweise von Dyomics (Jena, Deutschland) zur Verfügung gestellt. *N*-Hydroxysuccinimid (NHS; 98 %), Tosylchlorid (TosCl; 98 %), 7-Mercapto-4-methylcumarin (MMC; 97 %) und Trifluoressigsäure wurde über Sigma-Aldrich bezogen. *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC; 99 %) und *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (DSC; 98 %) wurden von Carbolution Chemicals (St. Ingbert, Deutschland) erhalten. 4-(1-Pyrrolidiny)pyridin (4-PP) wurde von Fluka erworben. Ethanolamin wurde von Riedel-de Haën (Seelze, Deutschland) bezogen. Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*) und 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin wurden von Tokyo Chemical Industry (Eschborn, Deutschland) erhalten. Wässrige Wasserstoffperoxidlösung (30 %), Lithiumchlorid, Kaliumbromid (für FT-IR-Spektroskopie) und Dialysemembranen aus regenerierter Cellulose (Spectra/Por® 3; Ausschlussgrenze der molaren Masse: beide 3500 g mol^{-1} ; nominelle Flachbreite: 18 oder 45 mm) wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Glimmerscheiben (Klasse V3; 9,9 mm) wurden von Plano (Wetzlar, Deutschland) erhalten. Quantifoil® Netzen (R 3.5/1) wurden von Quantifoil Micro Tools (Großlobichau, Deutschland) erworben. Assistent® Objektträger (Lot.: 3204284; $76 \times 26\text{ mm}$) wurden von Glas-

warenfabrik Karl Hecht (Sondheim v. d. Rhön, Deutschland) erhalten. Whatman™ Puradisc™ Spritzenfilter (Nylon; Porengröße: 0,2 µm; Durchmesser: 25 mm) wurden von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) bezogen.

Für Synthesen wurden wasserfreies *N,N*-Dimethylacetamid (DMA), *N,N*-Dimethylformamid (DMF) und Pyridin von Acros Organics (Geel, Belgien) in versiegelten Gefäßen erworben, die Molekularsieb enthielten. Deuteriertes Dimethylsulfoxid (DMSO-*d*₆) wurde für NMR-Experimente von Deutero (Kastellaun, Deutschland) erhalten. Für UV/Vis- und fluoreszenzspektroskopische Untersuchungen wurden DMA, DMSO und Aceton in spektrophotometrischer Qualität von Sigma-Aldrich sowie Reinstwasser (HPLC-Qualität) von Carl Roth bezogen. Reinstwasser (HPLC-Qualität) wurde ebenfalls in der dynamischen Lichtstreuung und für die Herstellung von Nanopartikeln (NP) mittels Eintropfmethode genutzt. Entionisiertes Wasser wurde für die Herstellung von NP mittels Dialyse verwendet. Für Experimente in Bezug auf Immunassays wurde Reinstwasser eingesetzt, das mittels Umkehrosmose in einer Reinstwasseranlage Milli-Q-1 (Millipore) gewonnen wurde. Wässrige Salzsäure- bzw. Natriumhydroxidmaßlösung (je 0,1 mol l⁻¹) für Titrationsen wurde von Fluka erhalten.

Alle Pufferlösungen wurden mit Reinstwasser (Umkehrosmose-Qualität) hergestellt. Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, *Phosphate Buffered Saline*; 1,2 mol l⁻¹ NaCl; 0,25 mol l⁻¹ Na₂HPO₄; 0,05 mol l⁻¹ KH₂PO₄; pH = 7,3), Phosphatpuffer (PB, *Phosphate Buffer*; 0,025 mol l⁻¹ Na₂HPO₄; 0,005 mol l⁻¹ KH₂PO₄ oder 0,25 mol l⁻¹ Na₂HPO₄; 0,05 mol l⁻¹ KH₂PO₄; pH = 6,5 oder 7,3), 2-(*N*-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer; 0,1 mol l⁻¹; pH = 5,5 oder 6,5), Natriumboratpuffer (0,085 mol l⁻¹; pH = 8,9), Kaliumcitratpuffer (0,3 mol l⁻¹; pH = 4,0) und Natriumcarbonatlösung (0,2 mol l⁻¹) wurden durch die entsprechenden Salze bzw. Säuren hergestellt, die über Carl Roth bezogen wurden. Die Pufferlösungen wurden mit wässriger Salzsäure- bzw. Natriumhydroxidlösung (je 1 mol l⁻¹) eingestellt. Kaliumcitratpuffer wurde mit wässriger Kaliumhydroxidlösung (2 mol l⁻¹) eingestellt.

Die Antikörper anti-humanen C-reaktiven Protein Antikörper 6404 und 6405 (anti-hCRP AK 6404 und 6405; beide monoklonal, Immunglobuline G) wurden von Medix (Espoo, Finnland) erworben. Ziege anti-Maus Immunglobulin G, Goldnanopartikel (60 nm; mit Citrat stabilisiert) und Goldstabilisierungspuffer wurden von Senova (Weimar, Deutschland) erhalten. Das Antigen humanes C-reaktives Protein (hCRP) wurde von BioTrend (Köln, Deutschland) bezogen. *N*-Hydroxysulfosuccinimid-Natriumsalz (s-NHS) wurde von G Bioscience (St. Louis, MO, US) erhalten. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid Hydrochlorid (EDC) wurde von PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland) erworben. Caseinpufferkonzentrat (CBC, *Casein Buffer Concentrate*) wurde von SDT (Baesweiler, Deutschland) bezogen. Bovines Serumalbumin (BSA) wurde von Serva (Heidelberg, Deutschland) erworben. Coomassie® Brillantblau G 250, Saccharose und Tween® 20 wurden von Sigma-Aldrich bezogen. Nitrocellulosemembran (CN 140; 2,5 cm) wurde von Sartorius (Göttingen, Deutschland) erhalten. Trägerkarte (6 cm), Saugkissen (Baumwollfasermem-

bran; Typ 222; 1,8 cm), Konjugatkissen (Glasfasermembran; Typ 8964; 1,2 cm) und Probenkissen (Glasfasermembran; Typ 9864; 1,8 cm) wurden von Ahlstrom (Helsinki, Finnland) bezogen.

Alle weiteren Chemikalien wurden bei Sigma-Aldrich bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Messmethoden

Alle Messungen wurden gemäß standardisierten Verfahren hausintern durchgeführt.

Elementaranalyse (EA)

EA wurden mit einem VARIO EL III CHNS Analysator (Elementar Analysensysteme, Hanau, Deutschland) durchgeführt. Der Chlorgehalt wurde nach standardisierten Verfahren bestimmt, indem die organischen Proben verbrannt und mit AgNO_3 sowie einer chloridsensitiven Elektrode automatisiert potenziometrisch titriert wurden. Die durchschnittlichen Substitutionsgrade (DS) und die molaren durchschnittlichen Substitutionsgrade (MS) wurden mittels der in Tabelle 19 gelisteten Werte und nach folgenden Gleichungen berechnet.

Für die Derivate **NHS-CAP 1** und **4–9** wurde der Gehalt an Succinimidylgruppen (MS_{NHS}) berechnet und Acetat- sowie Phthalatgruppen (DS_{Ac} und DS_{Ph}) als bekannt angenommen:

$$A_{\text{NHS}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} M_{\text{AGE}}}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{NHS}} - M_{\text{H}})} \quad (8)$$

$$B_{\text{NHS/Ac}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{Ac}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{NHS}} - M_{\text{H}})} \quad (9)$$

$$B_{\text{NHS/Ph}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{Ph}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{NHS}} - M_{\text{H}})} \quad (10)$$

$$\text{MS}_{\text{NHS}} = A_{\text{NHS}} + \text{DS}_{\text{Ac}} B_{\text{NHS/Ac}} + \text{DS}_{\text{Ph}} B_{\text{NHS/Ph}} \quad (11)$$

Für die Derivate **NHS-CAP 2** und **3** wurde der Gehalt an Succinimidyl- und Desoxychlorgruppen (MS_{NHS} und DS_{Cl}) berechnet und Acetat- sowie Phthalatgruppen in das Polymerrückgrat (AGE-CAP) einbezogen:

$$A_{\text{NHS}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} M_{\text{AGE-CAP}}}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{NHS}} - M_{\text{H}})} \quad (12)$$

$$A_{\text{Cl}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} M_{\text{AGE-CAP}}}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (13)$$

$$B_{\text{NHS/Cl}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{NHS}} - M_{\text{H}})} \quad (14)$$

$$B_{\text{Cl/NHS}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{NHS}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (15)$$

$$\text{MS}_{\text{NHS}} = \frac{A_{\text{NHS}} + A_{\text{Cl}} B_{\text{NHS/Cl}}}{1 - B_{\text{NHS/Cl}} B_{\text{Cl/NHS}}} \quad \text{DS}_{\text{Cl}} = \frac{A_{\text{Cl}} + A_{\text{NHS}} B_{\text{Cl/NHS}}}{1 - B_{\text{NHS/Cl}} B_{\text{Cl/NHS}}} \quad (16)$$

Für das Derivat **CB-CAP** wurde der Gehalt an 4-Chlorbenzylaminogruppen (MS_{CB}) berechnet und Acetat- sowie Phthalatgruppen (DS_{Ac} und DS_{Ph}) als bekannt angenommen:

$$A_{\text{CB}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} M_{\text{AGE}}}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{CB}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (17)$$

$$B_{\text{CB/Ac}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Ac}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{CB}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (18)$$

$$B_{\text{CB/Ph}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Ph}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{CB}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (19)$$

$$\text{MS}_{\text{CB}} = A_{\text{CB}} + \text{DS}_{\text{Ac}} B_{\text{CB/Ac}} + \text{DS}_{\text{Ph}} B_{\text{CB/Ph}} \quad (20)$$

Für das Derivat **MAL-C 7** wurde der Gehalt an 6-Maleimidohexanoat- und Desoxychlorogruppen (MS_{MAL} und DS_{Cl}) wie folgt berechnet:

$$A_{\text{MAL}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} M_{\text{AGE}}}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (21)$$

$$A_{\text{Cl}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} M_{\text{AGE}}}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (22)$$

$$B_{\text{MAL/Cl}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (23)$$

$$B_{\text{Cl/MAL}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (24)$$

$$\text{DS}_{\text{MAL}} = \frac{A_{\text{MAL}} + A_{\text{Cl}} B_{\text{MAL/Cl}}}{1 - B_{\text{MAL/Cl}} B_{\text{Cl/MAL}}} \quad \text{DS}_{\text{Cl}} = \frac{A_{\text{Cl}} + A_{\text{MAL}} B_{\text{Cl/MAL}}}{1 - B_{\text{MAL/Cl}} B_{\text{Cl/MAL}}} \quad (25)$$

Für die Derivate **MAL-CA 1** und **2** wurde der Gehalt an 6-Maleimidohexanoatgruppen (DS_{MAL}) berechnet und Acetatgruppen (DS_{Ac}) als bekannt angenommen:

$$A_{\text{MAL}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} M_{\text{AGE}}}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (26)$$

$$B_{\text{MAL/Ac}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{Ac}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (27)$$

$$\text{DS}_{\text{MAL}} = A_{\text{MAL}} + \text{DS}_{\text{Ac}} B_{\text{MAL/Ac}} \quad (28)$$

Für die Derivate **MAL-CA 3** und **4** wurde der Gehalt an 6-Maleimidohexanoat- und Desoxychlorgruppen (MS_{MAL} und DS_{Cl}) berechnet und Acetatgruppen (DS_{Ac}) als bekannt angenommen:

$$A_{\text{MAL}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} M_{\text{AGE}}}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (29)$$

$$A_{\text{Cl}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} M_{\text{AGE}}}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (30)$$

$$B_{\text{MAL}/\text{Ac}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%}(M_{\text{Ac}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%}(M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (31)$$

$$B_{\text{Cl}/\text{Ac}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%}(M_{\text{Ac}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%}(M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (32)$$

$$B_{\text{MAL}/\text{Cl}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%}(M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%}(M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (33)$$

$$B_{\text{Cl}/\text{MAL}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%}(M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%}(M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (34)$$

$$\text{DS}_{\text{MAL}} = \frac{A_{\text{MAL}} + A_{\text{Cl}}B_{\text{MAL}/\text{Cl}} + \text{DS}_{\text{Ac}}(B_{\text{MAL}/\text{Ac}} + B_{\text{Cl}/\text{Ac}}B_{\text{MAL}/\text{Cl}})}{1 - B_{\text{MAL}/\text{Cl}}B_{\text{Cl}/\text{MAL}}} \quad (35)$$

$$\text{DS}_{\text{Cl}} = \frac{A_{\text{Cl}} + A_{\text{MAL}}B_{\text{Cl}/\text{MAL}} + \text{DS}_{\text{Ac}}(B_{\text{Cl}/\text{Ac}} + B_{\text{MAL}/\text{Ac}}B_{\text{Cl}/\text{MAL}})}{1 - B_{\text{MAL}/\text{Cl}}B_{\text{Cl}/\text{MAL}}} \quad (36)$$

Für die Derivate **CUM-CA 1–4** wurde der Gehalt an (4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)thiogruppen (MS_{CUM}), 2,5-Dioxopyrrolidin-1-ylhexanoyl-/6-Maleimidohe-xanoatgruppen ($\text{DS}_{\text{DOP}}/\text{DS}_{\text{MAL}}$, beide zusammengefasst in DS_{MAL}) sowie Desoxy-chlorogruppen (DS_{Cl}) berechnet und Acetatgruppen in das Polymerrückgrat (AGE-CA) einbezogen:

$$A_{\text{CUM}} = \frac{\frac{\text{S \%}}{100 \%}M_{\text{AGE-CA}}}{M_{\text{S}} - \frac{\text{S \%}}{100 \%}M_{\text{CUM}}} \quad (37)$$

$$A_{\text{MAL}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%}M_{\text{AGE-CA}}}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%}(M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (38)$$

$$A_{\text{Cl}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} M_{\text{AGE-CA}}}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (39)$$

$$B_{\text{CUM/MAL}} = \frac{\frac{\text{S \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{S}} - \frac{\text{S \%}}{100 \%} M_{\text{CUM}}} \quad (40)$$

$$B_{\text{CUM/Cl}} = \frac{\frac{\text{S \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})}{M_{\text{S}} - \frac{\text{S \%}}{100 \%} M_{\text{CUM}}} \quad (41)$$

$$B_{\text{MAL/CUM}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} M_{\text{CUM}}}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (42)$$

$$B_{\text{MAL/Cl}} = \frac{\frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})}{M_{\text{N}} - \frac{\text{N \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})} \quad (43)$$

$$B_{\text{Cl/CUM}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} M_{\text{CUM}}}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (44)$$

$$B_{\text{Cl/MAL}} = \frac{\frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{MAL}} - M_{\text{H}})}{M_{\text{Cl}} - \frac{\text{Cl \%}}{100 \%} (M_{\text{Cl}} - M_{\text{H}} - M_{\text{O}})} \quad (45)$$

$$\begin{aligned} \text{MS}_{\text{CUM}} = & \frac{A_{\text{CUM}}(1 - B_{\text{Cl/MAL}}B_{\text{MAL/Cl}})}{1 - B_{\text{CUM/MAL}}B_{\text{MAL/CUM}} - B_{\text{CUM/Cl}}B_{\text{Cl/CUM}}} \dots \\ & \dots \frac{+ A_{\text{MAL}}(B_{\text{CUM/MAL}} + B_{\text{Cl/MAL}}B_{\text{CUM/Cl}})}{- B_{\text{MAL/Cl}}B_{\text{Cl/MAL}} - B_{\text{CUM/MAL}}B_{\text{MAL/Cl}}B_{\text{Cl/CUM}}} \dots \\ & \dots \frac{+ A_{\text{Cl}}(B_{\text{CUM/Cl}} + B_{\text{MAL/Cl}}B_{\text{CUM/MAL}})}{- B_{\text{CUM/Cl}}B_{\text{MAL/CUM}}B_{\text{Cl/MAL}}} \quad (46) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
DS_{MAL} = & \frac{A_{MAL}(1 - B_{CI/CUM}B_{CUM/CI})}{1 - B_{CUM/MAL}B_{MAL/CUM} - B_{CUM/CI}B_{CI/CUM}} \dots \\
& \dots \frac{+ A_{CUM}(B_{MAL/CUM} + B_{CI/CUM}B_{MAL/CI})}{- B_{MAL/CI}B_{CI/MAL} - B_{CUM/MAL}B_{MAL/CI}B_{CI/CUM}} \dots \\
& \dots \frac{+ A_{CI}(B_{MAL/CI} + B_{CUM/CI}B_{MAL/CUM})}{- B_{CUM/CI}B_{MAL/CUM}B_{CI/MAL}} \quad (47)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
DS_{CI} = & \frac{A_{CI}(1 - B_{CUM/MAL}B_{MAL/CUM})}{1 - B_{CUM/MAL}B_{MAL/CUM} - B_{CUM/CI}B_{CI/CUM}} \dots \\
& \dots \frac{+ A_{MAL}(B_{CI/MAL} + B_{CUM/MAL}B_{CI/CUM})}{- B_{MAL/CI}B_{CI/MAL} - B_{CUM/MAL}B_{MAL/CI}B_{CI/CUM}} \dots \\
& \dots \frac{+ A_{CUM}(B_{CI/CUM} + B_{MAL/CUM}B_{CI/MAL})}{- B_{CUM/CI}B_{MAL/CUM}B_{CI/MAL}} \quad (48)
\end{aligned}$$

Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR-Spektroskopie)

FT-IR-Spektren wurden mit einem Nicolet iS5 Spektrometer (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgenommen. Die festen Polysaccharidproben (PS-Proben) wurden mit KBr zu Presslingen verarbeitet und in Transmission gemessen.

Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie, *Nuclear Magnetic Resonance*)

NMR-Spektren der PS wurden bei 60 °C in DMSO- d_6 (120 mg ml⁻¹) mit einem Bruker Avance I 250 MHz Spektrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Deutschland), ausgestattet mit einem BBO Probenkopf, und einem Bruker Avance III 400 MHz Spektrometer (Bruker Biospin), ausgestattet mit einem BBFO Probenkopf, aufgenommen. Es wurden 16 Scans für ¹H-NMR-Spektren und 8192 bis 12 288 Scans für ¹³C-NMR-Spektren gemessen. Für die Signalzuordnung wurden die Kohlenstoffatome fortlaufend nummeriert, ausgehend von der Anhydroglucoseeinheit (AGE, 1–6) zur Acetatgruppe (7, 8), Phthalatgruppe (9–16) bzw. Maleimidohexanoatgruppe (9–16) und schließlich Succinimidyl-/Phthalamatgruppe (≥ 17) bzw. Cumarinsuccinimidylhexanoylgruppe (≥ 17). Für die Quantifizierung mittels ¹H-NMR wurden 20 Tropfen Trifluoressigsäure zur Probe gegeben, um Signale der Hydroxygruppen und des Wassers ins Tieffeld zu verschieben. Die DS- und MS-Werte wurden aus den Integralen (Int) nach Gleichungen 49 berechnet.

$$DS_{Ac} = \frac{7 \cdot \text{Int}_{H-8}}{3 \cdot \text{Int}_H (AGE)} \quad DS_{Ph} = \frac{7 \cdot \text{Int}_H (\text{aromatisch})}{4 \cdot \text{Int}_H (AGE)} \quad MS_{NHS} = \frac{7 \cdot \text{Int}_{H-18}}{4 \cdot \text{Int}_H (AGE)} \quad (49)$$

Tabelle 19. Molare Massen (M) der Wiederholungseinheiten, Substituenten und Elemente sowie durchschnittliche Substitutionsgrade (DS) für die Berechnung der DS und molaren durchschnittlichen Substitutionsgrade (MS).

	DS	M g mol ⁻¹
Wiederholungseinheit^a		
AGE	-	162,14
AGE-CAP	-	347,43
AGE-CA	-	262,91
Substituenten^b		
Ac	1,98	43,04
Ph	0,69	149,12
NHS	-	98,08
CB	-	140,59
MAL	-	194,11
CUM	-	192,23
Elemente		
C	-	12,01
H	-	1,01
Cl	-	35,45
N	-	14,01
O	-	16,00
S	-	32,06

^a Anhydroglucoseeinheit (AGE), AGE-CAP von Celluloseacetatphthalat ($DS_{Ac} = 1,98$ und $DS_{Ph} = 0,69$), AGE-CA von Celluloseacetat ($DS_{Ac} = 2,4$).

^b Acetat (Ac), Phthalat (Ph), N-Succinimidyl (NHS), 4-Chlorbenzylamino (CB), 6-Maleimidohexanoat (MAL), (4-Methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)thio (CUM).

Dynamische Lichtstreuung (DLS)

Der hydrodynamische Durchmesser (d), Polydispersitätsindex (PDI) und Zetapotenzial (ζ) der NP wurden mittels DLS an einem Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Herrenberg, Deutschland) mit einer Wellenlänge von 633 nm und einem Detektionswinkel von 173° gemessen. Die Titration der Proben wurde an einem Zetasizer Nano ZS, ausgestattet mit einem Autotitrator MPT-2 (Malvern Instruments), unter Verwendung von wässriger Salzsäure- bzw. Natriumhydroxidmaßlösung (je 0,1 mol l⁻¹) durchgeführt. Die durchschnittliche Partikelgröße wurde als effektiver (Z -Average) Durchmesser und die Breite der Größenverteilung als PDI mittels einer Kumulantenanalyse unter der Annahme einer sphärischen Form ermittelt. Die Proben, hergestellt mit Dialyse oder Eintropfmethode, wurden vor der Messung mit Wasser (1:10) verdünnt. Für jede Probe sind die Durchschnittswerte \pm Standardab-

weichungen von drei aufeinanderfolgenden DLS-Messungen angegeben.

Rasterelektronenmikroskopie (REM)

REM-Aufnahmen wurden an einem Sigma VP Field Emission Scanning Electron Microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit InLens Detektor und einer Beschleunigungsspannung von 5 kV durchgeführt. Die Proben, hergestellt mit Dialyse oder Eintropfmethode, wurden vor der Messung mit Wasser (1:10) verdünnt. Für die Probenvorbereitung wurden 10 µl verdünnte Partikelsuspension auf einer Glimmerscheibe getrocknet und mit einer dünnen Schicht aus Gold mittels Sputterbeschichtung an einem Hummer X (Anatech, Union City, CA, US) überzogen.

Kryo-Transmissionselektronenmikroskopie (Kryo-TEM)

Kryo-TEM-Aufnahmen wurden an einem FEI Tecnai G² 20 Kryo-Transmissionselektronenmikroskop (FEI, Dreieich, Deutschland) mit einer Beschleunigungsspannung von 120 kV durchgeführt. Die Proben, hergestellt mit Dialyse oder Eintropfmethode, wurden vor der Messung mit Wasser (1:10) verdünnt. Die Reinigung der Quantifoil® Netzchen erfolgte mittels Argonplasma für 120 s. Es wurden 9,5 µl verdünnte Partikelsuspension mithilfe eines Vitrobot Mark IV (FEI) auf die Netzchen aufgebracht. Die Proben wurden in flüssigem Ethan eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, bevor sie mit einer Kryotransfereinheit (Gatan, München, Deutschland) in das Mikroskop eingebracht wurden.

Trübungsmessung

Die Trübungsmessungen wurden mit einem Turbiquant® 3000 IR (Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt und sind in *Nephelometric Turbidity Units* (NTU) angegeben.

Größenausschlusschromatographie (SEC, *Size Exclusion Chromatography*)

SEC wurde an einem JASCO System (JASCO, Pfungstadt, Deutschland) mit Pumpe (PU-980) und Brechungsindexdetektor (RI-930) durchgeführt. Die Trennung erfolgte über eine PSS NOVEMA 3000 Å Säule (Polymer Standards Service, Mainz, Deutschland) in Serie mit einer PSS NOVEMA 300 Å Säule. Es wurde DMSO mit 0,5 % Lithiumbromid als Eluent (65 °C; Flussrate: 0,5 ml min⁻¹) und Pullulan als Kalibrationsstandard genutzt.

Ultraviolett/sichtbar-Spektroskopie (UV/Vis-Spektroskopie, *Ultraviolet/Visible*)

Alle UV/Vis-Experimente wurden mit DMA, DMSO und Aceton in spektrophotometrischer Qualität bzw. Wasser (HPLC-Qualität) durchgeführt.

Lösungen wurden an einem Lambda 25 UV/Vis-Spektrophotometer (PerkinElmer, Waltham, MA, US) unter Verwendung von Hellma 110-QS (10 mm) Quartzglas-küvetten (Hellma, Müllheim, Deutschland) gemessen. Lösungen von SB in DMA/Wasser-Mischungen (φ_{DMA} von 10 bis 100 %) mit einer Farbstoffkonzentration von $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ und $2,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ wurden durch Verdünnung einer SB-Stamm-

lösung ($7,86 \cdot 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) in DMA hergestellt. In einem typischen Beispiel wurden 127 μl Stammlösung in einem 10 ml Maßkolben mit 8,873 ml DMA und 1 ml Wasser versetzt. Das restliche Volumen, verursacht durch Volumenkontraktion, wurde mit einer DMA/Wasser-Mischung des gewünschten Verhältnisses ($\varphi_{\text{DMA}} = 90\%$) aufgefüllt, um eine Lösung mit $1,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ SB in DMA/Wasser ($\varphi_{\text{DMA}} = 90\%$) zu erhalten. Die Extinktionskoeffizienten wurden durch Messung der Absorption bei zwei Farbstoffkonzentrationen bestimmt. Lyophilisierte gefärbte Partikel **NHS-CAP-DY-NP 6** wurden in DMSO gelöst und verdünnt, um Absorptionswerte zwischen 0 und 1 zu erreichen. Die gemessene Absorption wurde über eine Kalibrationskurve des Farbstoffs DY-605 in DMSO mit der Farbstoffkonzentration korreliert. Die erhaltene Konzentration wurde auf das ursprüngliche Volumen vor der Verdünnung bezogen.

Opake CAP/SB-Filme wurden mittels Regeneration aus DMA durch Lösungsmittelaustausch mit Wasser hergestellt. CAP ($0,5 \text{ mol l}^{-1}$) und verschiedene Mengen von SB ($0,005$; $0,01$; $0,02$ und $0,04 \text{ mol l}^{-1}$) wurden in 1 ml DMA gelöst. Mithilfe einer Rakel (Spalthöhe: $100 \mu\text{m}$) wurden diese Lösungen auf Assistent® Objektträger gestrichen und anschließend in 21 entionisiertem Wasser gefällt. Die opaken Filme wurden an Luft getrocknet und im Zentrum einer Ulbricht-Kugel (150 mm ; InGaAs) an einem Lambda 950 UV/Vis-Spektrophotometer (PerkinElmer) gemessen.

Transparente CAP/SB-Filme wurden mittels Regeneration aus Aceton durch Verdunstung des Lösungsmittels hergestellt. Für Filme mit einem Farbstoffgehalt $w_{\text{SB}} > 1,5\%$ wurden die erforderlichen Mengen an SB direkt zu 1 ml ($0,4 \text{ mol l}^{-1}$) CAP-Stammlösung gegeben, um die gewünschten Endgehalte zu erreichen. Für Filme mit einem Farbstoffgehalt $w_{\text{SB}} < 1,5\%$ wurden definierte Volumina einer SB-Stammlösung ($0,011 \text{ mol l}^{-1}$) zu 1 ml ($0,4 \text{ mol l}^{-1}$) CAP-Stammlösung gegeben, um die gewünschten Endgehalte zu erreichen. Mithilfe einer Rakel (Spalthöhe: $100 \mu\text{m}$) wurden diese Lösungen auf Assistent® Objektträger gestrichen und anschließend an Luft getrocknet, um das Aceton zu entfernen. Es wurden transparente Filme erhalten, die im Transmissionsmodus an einem Lambda 950 UV/Vis-Spektrophotometer (PerkinElmer) gemessen wurden.

Für die Aufnahme der UV/Vis-Spektren von festem SB wurden vorgegebene Farbstoffmengen ($0,11$; $0,57$ und $1,14 \text{ mg}$) in je $2,5 \text{ ml}$ Aceton gelöst. Die Lösungen wurden in vierseitig polierte Hellma 111-QS (10 mm) Quartzglasküvetten (Hellma) gefüllt und das Lösungsmittel wurde zuerst in einem Stickstoffstrom sowie anschließend bei 70°C unter Vakuum verdampft. Die farbstoffbeschichteten Küvetten wurden im Zentrum einer Ulbricht-Kugel an einem Lambda 950 UV/Vis-Spektrophotometer (PerkinElmer) gemessen.

Die Partikelsuspensionen **CAP-SB-NP 5** und **CUM-CA-NP 1–6**, erhalten durch Dialyse, wurden mit Wasser auf bestimmte Volumenanteile ($\varphi_{\text{Suspension}}$) verdünnt, um Absorptionswerte zwischen 0 und 1 zu erreichen. Die verdünnten Suspensionen wurden im Zentrum einer Ulbricht-Kugel an einem Lambda 950 UV/Vis-Spektrophotometer (PerkinElmer) unter Verwendung von vierseitig polierten Hell-

ma 111-QS (10 mm) Quartzglasküvetten (Hellma) gemessen.

Die mit Enzym HRP behandelten wässrigen Partikelsuspensionen **NHS-CAP-HRP-NP** und **CA-HRP-NP** wurden in einem Enzymassay entsprechend der Literatur gemessen.^[151] In einem typischen Beispiel wurde wie folgt vorgegangen. Für die Substratlösung wurden 78 ml ($0,3 \text{ mol l}^{-1}$; $\text{pH} = 4,0$) Kaliumcitratpuffer über einen Spritzenfilter (Nylon; Porengröße: $0,2 \mu\text{m}$) steril filtriert. Es wurden 20 mg 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 2053 μl DMA gelöst. Der Puffer wurde mit 25 μl (30 %) wässriger Wasserstoffperoxidlösung und 1951 μl Benzidinlösung versetzt, um die Substratlösung zu erhalten. Anschließend wurden 50 μl verdünnte Partikelsuspension oder Überstand zu 2 ml Substratlösung gegeben und homogenisiert. Nach einer Reaktionszeit von 15 min wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 500 μl (1 mol l^{-1}) wässriger Schwefelsäurelösung gestoppt. Die erhaltenen Lösungen wurden an einem Lambda 25 UV/Vis-Spektrophotometer (PerkinElmer) unter Verwendung von Hellma 110-QS (10 mm) Quartzglasküvetten (Hellma) gemessen. Die Absorptionswerte bei $\lambda = 450 \text{ nm}$ wurden korrigiert, indem der Absorptionswert der Referenzmessung (Wasser ohne HRP) abgezogen wurde. Die korrigierten Absorptionswerte wurden über eine Kalibrationskurve des Enzyms HRP in Wasser mit der Enzymkonzentration korreliert. Die Konzentration wurde auf das ursprüngliche Volumen vor der Verdünnung bezogen. Die Enzymkonzentration der Partikel wurde korrigiert, indem die Konzentration der Überstände abgezogen wurde. Die korrigierte Enzymkonzentration wurde durch die Massenkonzentration der Partikelsuspension dividiert, um den relativen Meerrettichperoxidase (HRP) Gehalt (RHG in nmol g^{-1}) zu erhalten.

Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden in DMSO (spektrophotometrische Qualität) oder Wasser (HPLC-Qualität) an einem LS-50B Spektrofluorometer (PerkinElmer) unter Verwendung von vierseitig polierten Hellma 111-QS (10 mm) Quartzglasküvetten (Hellma) gemessen.

Die mit Farbstoff DY-605 behandelten wässrigen Partikelsuspensionen **NHS-CAP-DY-NP 1–6**, **CA-DY-NP 1–6** und **CAP-DY-NP 1–3** wurden wie folgt gemessen. Die Suspensionen wurden mit Wasser verdünnt, um Fluoreszenzintensitäten zwischen 0 und 1000 zu erreichen. Die Basislinie wurde nach folgender Gleichung mit vier Parametern korrigiert: $y = y_0 + a/(b + x^c)$, um Streueffekte der NP auszugleichen. Die Fläche unter der Fluoreszenzemissionskurve wurde integriert, auf das ursprüngliche Volumen vor der Verdünnung bezogen und durch die Massenkonzentration der Partikelsuspension dividiert, um die relative Fluoreszenzfläche (RFF in ml mg^{-1}) zu erhalten.

Die Lösungen der mit Farbstoff DY-605 behandelten Partikel **NHS-CAP-DY-NP 1–6**, **CA-DY-NP 1–6** und **CAP-DY-NP 1–3** in DMSO wurden wie folgt gemessen. Lyophilisierte gefärbte NP wurden in DMSO gelöst und auf bestimmte Konzentrationen verdünnt, bei denen Fluoreszenzintensitäten zwischen 0 und 1000

gemessen wurden. Die Fläche unter der Fluoreszenzemissionskurve wurde integriert und über eine Kalibrationskurve des Farbstoffs DY-605 in DMSO mit der Farbstoffkonzentration korreliert. Die Konzentration wurde auf das ursprüngliche Volumen vor der Verdünnung bezogen und durch die ursprüngliche Massenkonzentration des gelösten Partikelrückstands dividiert, um den relativen Farbstoffgehalt (RFG in $\mu\text{mol g}^{-1}$) zu erhalten.

Die Lösungen des Farbstoffs MMC und des Derivats **CUM-CA 3** in DMSO wurden bei verschiedenen Konzentrationen gemessen.

Die mit Farbstoff MMC behandelten wässrigen Partikelsuspensionen **CUM-CA-NP 1–6**, erhalten durch Dialyse, wurden mit Wasser auf bestimmte Volumenanteile ($\varphi_{\text{Suspension}}$) verdünnt, um Fluoreszenzintensitäten zwischen 0 und 1000 zu erreichen. Die Basislinie wurde korrigiert (siehe oben).

Bradford-Assay

Eine Bradford-Lösung wurde hergestellt, indem 10 mg Coomassie® Brillantblau G 250 in 10 ml Ethanol gelöst und mit 20 ml (85 %) wässriger Phosphorsäure sowie 160 ml Wasser versetzt wurden. Es wurden 50 μl Bradford-Lösung mit 100 μl Wasser verdünnt, zu 200 μl verdünnter Probe gegeben und bei 20 °C inkubiert. Nach 5 und 60 min wurde an einem Multiskan™ GO Mikrotiterplatten-Spektrophotometer (Thermo Scientific) die Absorption der Proben bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen und über eine Kalibrationskurve des anti-hCRP 6405 AK in Wasser mit der Massenkonzentration korreliert. Die Massenkonzentration wurde auf das ursprüngliche Volumen bezogen, um die ungebundene Masse des AK zu erhalten. Der Durchschnitt aus den ungebundenen Massen des AK nach 5 und 60 min Assay-Zeit wurde gebildet und von der eingesetzten Masse abgezogen, um die gebundene Masse des AK zu erhalten.

Nanopartikel

Herstellung der Nanopartikel

Dialyse

Die Herstellung der NP wurde mittels Dialyse entsprechend der Literatur durchgeführt.^[39] Für Komposit-NP und entsprechende unbeladene CA- sowie CAP-NP wurden die Ausgangspolymere CA ($DS_{Ac} = 2,3$) und CAP ($DS_{Ac} = 1,8$; $DS_{Ph} = 0,7$) verwendet. Für reaktive NHS- und Maleimid-NP sowie entsprechende CA- und CAP-NP im Vergleich wurden die Derivate **NHS-CAP 7**, **MAL-CA 4**, CA ($DS_{Ac} = 2,4$) und CAP ($DS_{Ac} = 1,98$; $DS_{Ph} = 0,69$) eingesetzt. In einem typischen Beispiel (**CA-NP 1**) wurden 20 mg CA in 10 ml DMA gelöst. In einem zweiten Beispiel (**CA-AA-NP 1**) wurden 20 mg CA und 10 mg AA in 10 ml DMA gelöst. In einem dritten Beispiel (**CUM-CA-NP 1**) wurden 20 mg **MAL-CA 4** und 0,92 mg (0,25 Äquiv. pro 6-Maleimidohexanoatgruppe) MMC in 10 ml DMA gelöst. Staubteilchen wurden durch Zentrifugation (9800 g; 5 min) abgetrennt und die klare Lösung wurde in einer Dialysemembran aus regenerierter Cellulose (18 mm breit) gegen 1 l entionisiertes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde fünfmal alle 3 h ausgewechselt, um eine wässrige Partikelsuspension zu erhalten.

Für NMR- und FT-IR-Experimente wurde ein großer Ansatz von NP hergestellt. In einem typischen Beispiel wurden 200 mg **NHS-CAP 7** in 50 ml DMA gelöst und in einer Dialysemembran aus regenerierter Cellulose (45 mm breit) gegen 3 l entionisiertes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde fünfmal alle 3 h ausgewechselt und die erhaltene wässrige Partikelsuspension wurde lyophilisiert.

Eintropfmethode

Die Herstellung der NP wurde mittels Eintropfmethode entsprechend der Literatur durchgeführt.^[39] Für Komposit-NP wurde das Ausgangspolymer CAP ($DS_{Ac} = 1,8$; $DS_{Ph} = 0,7$) verwendet. In einem typischen Beispiel (**CAP-SB-NP 7**) wurden 20 mg CAP und 10 mg SB in 5 ml Aceton gelöst. Staubteilchen wurden durch Zentrifugation (9800 g; 5 min) abgetrennt und die klare Lösung wurde unter Rühren (250 min^{-1}) vorgelegt. Anschließend wurden 15 ml Wasser (HPLC-Qualität) mittels einer AL-4000 Spritzenpumpe (World Precision Instruments, Sarasota, FL, US) bei einer Zutropfrate von 5 ml min^{-1} zur Lösung gegeben. Die erhaltene Suspension wurde bei 60°C erwärmt, bis das Aceton komplett verdampft war. Es wurde eine wässrige Partikelsuspension erhalten.

Behandlung der Nanopartikel

Funktionalisierung mit Ethanolamin

Es wurden 5 ml ($28,6 \mu\text{mol}$; etwa $\beta_{\text{NP}} = 2,4 \text{ mg ml}^{-1}$) wässrige Partikelsuspension **NHS-CAP-NP 2** mit 500 μl ($0,085 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 8,9) Natriumboratpuffer und 1,2 μl ($19,9 \mu\text{mol}$; 1 Äquiv. pro NHS-Estergruppe) Ethanolamin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 20°C für 16 h geschüttelt und in einer Dialysemembran aus regenerierter Cellulose (18 mm breit) gegen 600 ml entionisiertes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde fünfmal alle 3 h ausgewechselt. Die wässrige Partikelsuspension wurde für FT-IR-Experimente lyophilisiert.

Funktionalisierung mit Farbstoff DY-605

Alle Farbstofflösungen und farbstoffbehandelten Partikelsuspensionen wurden unter Lichtausschluss hergestellt und gelagert. Eine Stammlösung von 1 mg Farbstoff DY-605 wurde in 10 ml Wasser (HPLC-Qualität) hergestellt und verdünnt, um wässrige Farbstofflösungen mit $0,01$ und $0,10 \text{ mg ml}^{-1}$ zu erhalten. Es wurden verschiedene relative Farbstoffmengen (RFM, $n_{\text{DY}}/m_{\text{NP}}$ in $\mu\text{mol g}^{-1}$) eingesetzt. Für RFM von $0,36$ und $3,60 \mu\text{mol g}^{-1}$ wurden 2 ml (etwa $\beta_{\text{NP}} = 2,4 \text{ mg ml}^{-1}$) wässrige Partikelsuspension (**NHS-CAP-NP 2**, **CA-NP 5** oder **CAP-NP 5**) mit 200 μl ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 6,5) MES- oder ($0,085 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 8,9) Natriumboratpuffer und 200 μl ($0,01$ oder $0,10 \text{ mg ml}^{-1}$) Farbstofflösung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 20°C für 16 h geschüttelt und in einer Dialysemembran aus regenerierter Cellulose (18 mm breit) gegen 800 ml entionisiertes Wasser dialysiert. Das Wasser wurde fünfmal alle 3 h ausgewechselt. Experimente mit einem RFM von $18,0 \mu\text{mol g}^{-1}$ wurden analog durchgeführt, es wurden jedoch 2 ml wässrige Partikelsuspension mit 1000 μl Puffer und 1000 μl ($0,10 \text{ mg ml}^{-1}$) Farbstofflösung versetzt. Nach der Dialyse wurde ein Teil der wässrigen Partikelsuspension mit definiertem Volumen (etwa eine Hälfte) lyophilisiert. Die Masse des Rückstands wurde bestimmt, um die ursprüngliche Massenkonzentration zu berechnen. Zusätzlich wurden die lyophilisierten NP für Fluoreszenzmessungen in DMSO genutzt.

Funktionalisierung mit Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, *Horseradish Peroxidase*)

Eine Stammlösung von 2,77 mg HRP in 277 μl Wasser (HPLC-Qualität) wurde hergestellt. Es wurde eine relative Meerrettichperoxidase (HRP) Menge (RHM, $n_{\text{HRP}}/m_{\text{NP}}$ in $\mu\text{mol g}^{-1}$) eingesetzt. Für RHM von $5,33 \mu\text{mol g}^{-1}$ wurde 1 ml (etwa $\beta_{\text{NP}} = 2,4 \text{ mg ml}^{-1}$) wässrige Partikelsuspension (**NHS-CAP-NP 2** oder **CA-NP 5**) mit 100 μl ($0,085 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 8,9) Natriumboratpuffer und 54 μl (10 mg ml^{-1}) HRP-Lösung versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 20°C für 3 h geschüttelt. Die NP wurden zentrifugiert ($10\,000 g$; 6 min), der Überstand entfernt und der Rückstand in 1 ml Wasser für 3 min unter Ultraschall resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde zehnmal mit Zentrifugation ($10\,000 g$; 3 min) und Resuspendieren wiederholt. Der Überstand des letzten Waschgangs wurde für UV/Vis-Messungen zurückgestellt.

Immunassay

Für die folgenden Experimente wurde Reinstwasser (Umkehrosmose-Qualität) verwendet.

Herstellung der Nanopartikel-Antikörper-Konjugate

Die kovalente Kopplung der Komposit-NP mit AK wurde wie folgt durchgeführt. Es wurde 1 ml wässrige Partikelsuspension (**CAP-AA-NP 3**, **CAP-SR-NP 4** oder **CAP-SB-NP 5** und **18**) mit 100 μl ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 5,5) MES-Puffer versetzt. Für die Aktivierung der Carboxygruppen mit EDC/s-NHS wurden 100 μl einer Lösung beider Reagenzien (10 mg ml^{-1} EDC und 10 mg ml^{-1} s-NHS in Wasser) zugegeben und die Reaktionsmischung bei 20°C für 30 min geschüttelt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung dreimal zentrifugiert ($10\,000\text{ g}$; 5 min), der Überstand verworfen und der Rückstand in 1 ml Wasser für 3 min unter Ultraschall resuspendiert, um überschüssiges Aktivierungsreagenz zu entfernen. Die Suspension wurde mit 100 μl ($0,3 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 7,3) PB versetzt. Für die kovalente Kopplung wurden 60 μl (5 mg ml^{-1} in Wasser) anti-hCRP 6405 AK-Lösung zugegeben und die Reaktionsmischung bei 20°C für 2 h geschüttelt. Anschließend wurden 10 μl Ethanolamin zugegeben und bei 20°C für 1 h geschüttelt, um überschüssige reaktive Gruppen auf der Partikeloberfläche zu blocken. Die Reaktionsmischung wurde zweimal zentrifugiert ($10\,000\text{ g}$; 15 min), der Überstand verworfen und der Rückstand in 1 ml Wasser für 3 min unter Ultraschall resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation ($10\,000\text{ g}$; 15 min) wurde der Rückstand in 100 μl ($0,3 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 7,3; 10 % BSA) PBS für 3 min unter Ultraschall resuspendiert.

Die adsorptive Kopplung der Komposit-NP mit AK wurde entsprechend der kovalenten durchgeführt. Die Suspension wurde jedoch direkt mit PB und AK-Lösung versetzt, bei 20°C für 2 h geschüttelt und aufgereinigt.

Für DLS-Messungen wurden während der Herstellung des Konjugats nach den entsprechenden Arbeitsschritten 50 μl Proben entnommen.

Für den Bradford-Assay wurde die zuvor beschriebene kovalente Kopplung mit folgenden Änderungen durchgeführt. Es wurden 500 μl Partikelsuspension (**CAP-SB-NP 18**), 50 μl ($0,1 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 5,5) MES-Puffer, 50 μl EDC/s-NHS-Lösung (je 10 mg ml^{-1} in Wasser), 50 μl ($0,3 \text{ mol l}^{-1}$; pH = 6,5 oder 7,3) PB und 10 oder 30 μl ($4,8 \text{ mg ml}^{-1}$ in Wasser) anti-hCRP 6405 AK-Lösung eingesetzt. Die Reaktion des AK mit aktivierten NP erfolgte bei 20°C für 20 h, während im Verlauf nach 0;

2; 6 und 20 h die Reaktionsmischung zentrifugiert (14 000 *g*; 10 min), 20 μ l Probe vom Überstand entnommen und die Reaktionsmischung für 3 min unter Ultraschall resuspendiert wurde. Die Proben wurden mit Wasser auf 200 μ l verdünnt und mittels Bradford-Assay gemessen.

Die kovalente Kopplung der Gold-NP mit AK wurde wie folgt durchgeführt. Es wurden 5 ml wässrige Partikelsuspension mit 60 μ l (0,2 mol l⁻¹) Natriumcarbonatlösung versetzt. Nach Zugabe von 24 μ l (5 mg ml⁻¹ in Wasser) anti-hCRP 6405 AK-Lösung wurde die Reaktionsmischung bei 20 °C für 30 min geschüttelt. Es wurden 200 μ l Goldstabilisierungspuffer zugegeben und für weitere 10 min geschüttelt. Die Reaktionsmischung wurde zweimal zentrifugiert (10 000 *g*; 15 min), der Überstand verworfen und der Rückstand in 1 ml Goldstabilisierungspuffer für 3 min unter Ultraschall resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation (10 000 *g*; 15 min) wurde der Rückstand in 200 μ l Goldstabilisierungspuffer für 3 min unter Ultraschall resuspendiert.

Herstellung der Teststreifen

Die Teststreifen bestanden aus Probenkissen, Konjugatkissen, Nitrocellulosemembran und Saugkissen. Membran (2,5 \times 30 cm) und Saugkissen (1,8 \times 30 cm) wurden auf einer Trägerkarte (6 \times 30 cm) mit 2 mm Überlappung (Kissen über Membran) fixiert. Mithilfe eines BioDot XYZ-3000 (BioDot, Irvine, CA, US) wurde anti-hCRP 6404 AK-Lösung (0,25 bis 1,25 mg ml⁻¹ in 0,3 mol l⁻¹; pH = 7,3 PBS) als Testlinie mit 1 μ l cm⁻¹ auf die Membran aufgebracht. In gleicher Weise wurde eine Lösung von Ziege anti-Maus Immunglobulin G (0,5 mg ml⁻¹ in 0,3 mol l⁻¹; pH = 7,3 PBS) als Kontrolllinie mit 1 μ l cm⁻¹ und Abständen von 6 mm zur Testlinie sowie 5 mm zum Saugkissen auf die Membran aufgebracht. Die NP-AK-Konjugate wurden mit PB (0,03 mol l⁻¹; pH = 7,3; 1 % Saccharose) auf verschiedene AK-Konzentrationen (80 bis 400 μ g ml⁻¹) verdünnt. Anschließend wurden die verdünnten NP-AK-Konjugate mithilfe eines BioDot XYZ-3000 (BioDot) mit 10 μ l cm⁻¹ auf das Konjugatkissen (1,2 \times 30 cm) aufgebracht. Das beladene Konjugatkissen wurde bei 37 °C für 2 h getrocknet und auf der Trägerkarte mit einer Überlappung von 2 mm neben der Membran fixiert. Abschließend wurde ein Probenkissen (1,8 \times 30 cm) auf der Trägerkarte mit einer Überlappung von 2 mm neben dem Konjugatkissen fixiert. Der zusammengesetzte Streifen wurde in kleinere Teststreifen (4 \times 60 mm) geschnitten.

Die Leistung der Teststreifen im LFA wurde hinsichtlich der verschiedenen NP-AK-Konjugate optimiert, um hohe Sensitivitäten zu erreichen. Dafür wurden in Schachbrett-Titrations verschiedene Mengen Fänger-AK (anti-hCRP 6404 AK; 100 bis 500 ng je Streifen), immobilisiert als Testlinie auf der Membran, gegen verschiedene Mengen Detektions-AK (in Konjugaten gebundene anti-hCRP 6405 AK; 200 bis 1000 ng je Streifen) im Konjugatkissen getestet. Der Laufpuffer übt ebenso einen Einfluss auf die Leistung des LFA aus. Um die optimalen Parameter für den Test

auszuwählen, wurden Experimente mit verschiedenen hCRP-Konzentrationen (0; 0,1; 1 und 10 ng ml⁻¹) in verschiedenen Pufferlösungen durchgeführt. Für jedes NP-AK-Konjugat wurden optimale Pufferzusammensetzungen ausgewählt, die (I) keine unspezifische Bindung hervorriefen, (II) ein intensives optisches Signal bei kleinen hCRP-Konzentrationen lieferten und (III) die geringste Menge an NP-AK-Konjugat im Konjugatkissen benötigten (Tabelle 20).

Tabelle 20. Optimierte Parameter des *Lateral Flow Immunoassay* für verschiedene Nanopartikel-Antikörper-Konjugate (NP-AK-Konjugate).

Parameter	als optimal bestimmt für		
	CAP-AA-NP 2 ^a	CAP-SR-NP 2 ^a	CAP-SB-NP 2 ^a
Menge AK in Testlinie je Streifen	400 ng	400 ng	400 ng
Menge AK-NP-Konjugat je Streifen	1200 ng	1500 ng	600 ng
Laufpuffer ^b	PBS (0,3 mol l ⁻¹ ; pH = 7,3; 25 % CBC; 0,05 % Tween [®] 20)	PBS (0,3 mol l ⁻¹ ; pH = 7,3; 25 % CBC; 0,05 % Tween [®] 20)	PBS (0,3 mol l ⁻¹ ; pH = 7,3; 25 % CBC; 0,05 % Tween [®] 20)

^a Celluloseacetatphthalat (CAP), 2-Aminoanthrachinon (AA), Sudan IV (SR), Sudanschwarz B (SB).

^b Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, *Phosphate Buffered Saline*), Caseinpufferkonzentrat (CBC, *Casein Buffer Concentrate*).

Durchführung des *Lateral Flow Immunoassay*

Lösungen wurden mit unterschiedlichen hCRP-Konzentrationen in PBS-Laufpuffer (0,3 mol l⁻¹; pH = 7,3; 25 % CBC; 0,05 % Tween[®] 20) hergestellt. Es wurden 100 µl hCRP-Lösung auf das Probenkissen eines Teststreifens gegeben. Nach 10 min wurde die Farbintensität der Testlinie auf dem Streifen mithilfe eines ESE Quant Lateral Flow Reader (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemessen. Eine Kurvenanpassung an die Intensitäten des optischen Signals wurde mittels einer logistischen Regression mit vier Parametern entsprechend der Literatur vorgenommen.^[178] Die gemessene Nachweisgrenze wurde als die hCRP-Konzentration bestimmt, die einer Signalintensität von 30 mV der Messung entspricht. Der dynamische Arbeitsbereich wurde von der Konzentration an der gemessenen Nachweisgrenze bis zu der Konzentration bei

90 % des maximalen Signals bestimmt. Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) wurde am Mittelpunkt der Kurve berechnet.

Synthesen

NHS-Aktivester

Celluloseacetat-(*N*-succinimidyl)phthalat (NHS-CAP 1–9)

Für die Herstellung der NHS-Aktivester wurde das Ausgangspolymer CAP ($DS_{Ac} = 1,98$ und $DS_{Ph} = 0,69$) verwendet.

Veresterung mittels Carbodiimid (NHS-CAP 1)

Eine Lösung von 2,00 g (5,8 mmol) CAP in 50 ml DMA wurde mit 4,56 g (38,8 mmol) NHS versetzt. Anschließend wurden 0,83 g (4,0 mmol) DCC und 13 mg (0,1 mmol) 4-PP zur Reaktionsmischung gegeben und bei 20 °C für 48 h unter Rühren zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde durch Fällung in 400 ml Isopropanol isoliert, fünfmal mit 100 ml Methanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,10 g (5,2 mmol) **NHS-CAP 1** (90 %).

$DS_{Ac} = 1,98$; $DS_{Ph} = 0,69$; $MS_{NHS} = 0,59$ (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 52,94; H 4,57; N 2,04; gef.: C 52,56; H 4,66; N 2,04.

^{13}C -NMR (100 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 169,9$ – $168,7$ (CO); 162,0 (C-16); 133,5–125,9 (aromatisch); 102,1 (C-1); 99,1 (C-1); 79,9–71,7 (C-2–5); 63,7 (C-6); 62,3 (C-6); 25,4 (C-18); 20,2 (C-8); 19,9 ppm (C-8).

1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 8,0$ – $7,6$ (aromatisch); 5,4–3,6 (AGE); 2,9 (H-18); 2,0 ppm (H-8).

Veresterung mittels Iminiumchlorid (NHS-CAP 2 und 3, typisches Beispiel)

Eine Lösung von 2,00 g (5,8 mmol) CAP und 4,44 g (37,8 mmol) NHS in 50 ml DMF wurde bei –20 °C langsam über 1 h tropfenweise mit 1,6 ml (18,3 mmol) OC unter Rühren versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei –20 °C für 30 min gerührt, auf 20 °C über 1 h erwärmt und bei 60 °C für 16 h weitergerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 300 ml Ethanol isoliert und viermal mit 100 ml Ethanol gewaschen. Das Polymer wurde in 10 ml DMSO gelöst, in 200 ml Methanol umgefällt, dreimal mit 100 ml Methanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,13 g (5,1 mmol) **NHS-CAP 3** (89 %).

$DS_{Ac} = 1,98$; $DS_{Ph} = 0,69$; $MS_{NHS} = 0,66$; $DS_{Cl} = 0,15$ (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 52,54; H 4,48; Cl 1,26; N 2,24; gef.: C 51,99; H 4,52; Cl 1,26; N 2,24.

^{13}C -NMR (100 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 169,6$ – $163,1$ (CO); 162,1 (C-16);

133,8–129,4 (aromatisch); 101,7 (C-1); 99,1 (C-1); 79,7–70,5 (C-2–5); 63,7 (C-6); 62,0 (C-6); 25,3 (C-18); 20,2 (C-8); 19,9 ppm (C-8).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): δ = 8,0–7,7 (aromatisch); 5,4–3,5 (AGE); 2,9 (H-18); 1,9 ppm (H-8).

Veresterung mittels *N,N'*-Disuccinimidylcarbonat (NHS-CAP 4–7, typisches Beispiel)

Eine Lösung von 20,01 g (57,6 mmol) CAP in 400 ml DMA wurde mit 55,68 g (213,0 mmol) DSC und 17,5 ml (216,8 mmol) Pyridin versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C für 19 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 2 l Ethanol isoliert, fünfmal mit 1 l Ethanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 23,24 g (55,4 mmol) **NHS-CAP 7** (96 %).

DS_{Ac} = 1,98; DS_{Ph} = 0,69; MS_{NHS} = 0,75 (bestimmt durch EA); DS_{Ac} = 1,89; DS_{Ph} = 0,68; MS_{NHS} = 0,73 (bestimmt durch $^1\text{H-NMR}$ mit zugesetzter Trifluoressigsäure).

EA kalk. (%): C 52,82; H 4,52; N 2,49; gef.: C 51,60; H 4,43; N 2,49.

$^{13}\text{C-NMR}$ (63 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): δ = 169,6–163,4 (CO); 162,1 (C-16); 133,5–126,1 (aromatisch); 101,9 (C-1); 99,1 (C-1); 79,5–70,3 (C-2–5); 62,2 (C-6); 25,3 (C-18); 20,2 (C-8); 19,9 ppm (C-8).

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): δ = 8,0–7,8 (aromatisch); 5,4–3,8 (AGE); 2,9 (H-18); 2,0 ppm (H-8).

Veresterung mittels *N,N'*-Disuccinimidylloxalat (NHS-CAP 8 und 9, typisches Beispiel)

Es wurden 6,77 g (57,6 mmol) NHS mit 9,5 ml (117,7 mmol) Pyridin in 20 ml DMA gelöst. Die Lösung wurde auf –20 °C gekühlt und langsam tropfenweise mit 2,5 ml (28,6 mmol) OC unter Rühren versetzt. Die gebildete Suspension wurde bei –20 °C für 20 min gerührt, bis die Gasentwicklung beendet war. Die Suspension wurde auf 20 °C über 1 h erwärmt und zu einer Lösung von 2,01 g (5,8 mmol) NHS in 30 ml DMA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C für 16 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 500 ml Ethanol isoliert, viermal mit 200 ml Ethanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,43 g **NHS-CAP 9**.

EA gef. (%): C 50,87; H 4,41; N 2,27.

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): δ = 169,7–163,5 (CO); 162,2 (C-16); 156,5 (CO Ethylcarbonat); 133,7–126,1 (aromatisch); 98,9 (C-1); 76,3–71,0 (C-2–5); 62,7 (C-6 und CH_2 von Ethylcarbonat); 25,4 (C-18); 20,3 (C-8); 19,9 (C-8); 13,4 ppm (CH_3 von Ethylcarbonat).

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): δ = 7,9–7,8 (aromatisch); 5,2–3,8 (AGE und CH_2 von Ethylcarbonat); 2,9 (H-18); 1,9 (H-8); 1,3 ppm (CH_3 von Ethylcarbonat).

Celluloseacetat-*N*-(4-chlorbenzyl)phthalamat (CB-CAP)

Es wurden 283 mg (1,9 mmol; 1 Äquiv. pro NHS-Estergruppe) 4-Chlorbenzylamin in einer Spritze eingewogen und zu einer Lösung von 1,00 g (2,4 mmol) **NHS-CAP 7** in 10 ml DMA gegeben. Die gebildete Suspension wurde bei 20 °C für 2 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 200 ml Ethanol isoliert, viermal mit 100 ml Ethanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 0,91 g (2,1 mmol) **CB-CAP** (89 %).

DS_{Ac} = 1,98; DS_{Ph} = 0,69; MS_{CB} = 0,68 (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 56,34; H 4,82; Cl 5,58; N 2,21; gef.: C 54,66; H 4,78; Cl 5,58; N 2,26.

¹³C-NMR (63 MHz; DMSO-*d*₆; 60 °C): δ = 169,9–166,3 (CO); 138,1 (C-18); 131,2 (C-21); 128,9–127,9 (aromatisch); 128,9 (C-20); 127,9 (C-19); 99,2 (C-1); 76,0–70,7 (C-2–5); 61,9 (C-6); 41,9 (C-17); 20,2 (C-8); 20,0 ppm (C-8).

¹H-NMR (250 MHz; DMSO-*d*₆; 60 °C): δ = 8,8 (NH); 7,8–7,4 (aromatisch); 5,1–3,8 (AGE, H-17); 1,9 ppm (H-8).

Maleimidderivate

Cellulose-(6-maleimido)hexanoat (MAL-C 1–7)

Für die Herstellung der MAL-C-Derivate wurde Cellulose in DMA/Lithiumchlorid entsprechend der Literatur gelöst.^[17,112] Cellulose und Lithiumchlorid wurden bei 110 °C für 2 h getrocknet. Es wurden 2,00 g (12,3 mmol) getrocknete Cellulose in 60 ml DMA suspendiert und unter Rühren bei 120 °C für 2 h erhitzt. Nachdem die Suspension auf 80 °C abgekühlt war, wurden 3,6 g getrocknetes Lithiumchlorid zugegeben. Durch Abkühlen auf 20 °C über Nacht löste sich die Cellulose unter Rühren vollständig.

Veresterung mittels Carbodiimid (MAL-C 1 und 2, typisches Beispiel)

Eine Lösung von 2,00 g (12,3 mmol) Cellulose in 60 ml DMA wurde mit 3,91 g (18,4 mmol) MHS versetzt. Anschließend wurden 3,82 g (18,3 mmol) DCC und 61 mg (0,4 mmol) 4-PP zur Reaktionsmischung gegeben und bei 60 °C für 5 h unter Rühren zur Reaktion gebracht. Das Produkt wurde durch Fällung in 300 ml Wasser isoliert, viermal mit 200 ml Methanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 3,52 g **MAL-C 1**.

EA gef. (%): C 46,61; H 6,18; N 1,83.

Veresterung mittels Tosylchlorid (MAL-C 3–6, typisches Beispiel)

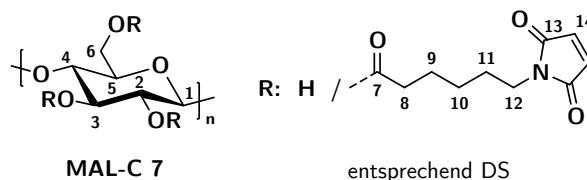
Eine Lösung von 1,99 g (12,3 mmol) Cellulose in 60 ml DMA wurde mit 1,45 g (6,8 mmol) MHS und 1,18 g (6,1 mmol) TosCl versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 60 °C für 5 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 300 ml

Aceton isoliert, viermal mit 200 ml Aceton gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,61 g **MAL-C 3**.

EA gef. (%): C 42,51; H 6,44; Cl 2,78; N 1,76.

Veresterung mittels Iminiumchlorid (**MAL-C 7**)



Es wurden 2,2 ml (25,1 mmol) OC bei –20 °C langsam über 1 h zu 20 ml DMF unter Rühren getropft. Die gebildete Suspension wurde bei –20 °C für 15 min gerührt und anschließend mit 5,30 g (25,0 mmol) MHS versetzt. Die Suspension wurde bei –20 °C für weitere 15 min gerührt und der Niederschlag löste sich auf. Die klare Lösung wurde bei 20 °C für 1 h gerührt und im Anschluss zu einer Lösung von 2,03 g (12,5 mmol) Cellulose in 60 ml DMA gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C für 5 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 400 ml Methanol isoliert, fünfmal mit 100 ml Methanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 5,32 g (13,0 mmol) **MAL-C 7** (quant.).

$DS_{MAL} = 1,28$; $DS_{Cl} = 0,05$ (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 55,05; H 5,86; Cl 0,40; N 4,37; gef.: C 54,97; H 5,90; Cl 0,40; N 4,37.

^{13}C -NMR (63 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 172,3$ (C-7); 170,7 (C-13); 134,2 (C-14); 102,2 (C-1); 79,4–71,8 (C-2–5); 62,7 (C-6); 36,7 (C-12); 32,9 (C-8); 27,4 (C-11); 25,4 (C-10); 23,6 ppm (C-9).

1H -NMR (250 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 6,9$ (H-14); 4,9–3,1 (AGE und H-12); 2,3 (H-8); 1,5 (H-9 und H-11); 1,3 ppm (H-10).

Celluloseacetat-(6-maleimido)hexanoat (**MAL-CA 1–4**)

Für die Herstellung der MAL-CA-Derivate wurde das Ausgangspolymer CA ($DS_{Ac} = 2,4$) verwendet.

Veresterung mittels Carbodiimid (**MAL-CA 1 und 2, typisches Beispiel**)

Eine Lösung von 1,00 g (3,8 mmol) CA in 30 ml DMA wurde mit 927 mg (4,4 mmol) MHS und 906 mg (4,3 mmol) DCC versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 60 °C für 16 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 350 ml Methanol isoliert, viermal mit 100 ml Methanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 865 mg (3,2 mmol) **MAL-CA 1** (83 %).

$DS_{Ac} = 2,40$; $DS_{MAL} = 0,05$ (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 49,80; H 5,63; N 0,26; gef.: C 48,60; H 5,69; N 0,26.

^{13}C -NMR (63 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 169,9$ – $168,7$ (CO); 99,0 (C-1); 75,7– $71,6$ (C-2–5); 62,2 (C-6); 20,2 (C-8); 19,9 ppm (C-8).

1H -NMR (250 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 5,0$ – $3,7$ (AGE); 2,0 ppm (H-8).

Veresterung mittels Tosylchlorid (MAL-CA 3)

Eine Lösung von 1,00 g (3,80 mmol) CA in 30 ml DMA wurde mit 1,61 g (7,6 mmol) MHS und 1,48 g (7,6 mmol) TosCl versetzt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung bei 60 °C für 5 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 300 ml Isopropanol isoliert, viermal mit 100 ml Ethanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 1,01 g (3,5 mmol) **MAL-CA 3** (91 %).

$DS_{Ac} = 2,40$; $DS_{MAL} = 0,15$; $DS_{Cl} = 0,02$ (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 50,53; H 5,62; Cl 0,26; N 0,71; gef.: C 48,70; H 5,52; Cl 0,26; N 0,71.

^{13}C -NMR (100 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 172,3$ (C-9); 170,7 (C-15); 169,9– $168,6$ (C-7); 134,1 (C-16); 99,0 (C-1); 75,7– $71,3$ (C-2–5); 62,0 (C-6); 36,7 (C-14); 32,9 (C-10); 27,2 (C-13); 25,3 (C-12); 23,5 (C-11); 20,2 (C-8); 19,8 ppm (C-8).

1H -NMR (400 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 6,9$ (H-16); 5,1– $3,2$ (AGE und H-14); 2,3 (H-10); 2,1– $1,9$ (H-8); 1,5 (H-11 und H-13); 1,3 ppm (H-12).

Veresterung mittels Iminiumchlorid (MAL-CA 4)

Es wurden 9,87 g (76,2 mmol) OC bei –20 °C langsam über 2 h zu 150 ml DMF unter Rühren getropft. Die gebildete Suspension wurde bei –20 °C für 30 min gerührt und anschließend mit 16,12 g (76,0 mmol) MHS versetzt. Die Suspension wurde bei –20 °C für weitere 15 min gerührt und der Niederschlag löste sich auf. Die klare Lösung wurde bei 20 °C für 1 h gerührt und im Anschluss zu einer Lösung von 10,03 g (38,2 mmol) CA in 150 ml DMF gegeben. Die Reaktionsmischung wurde bei 60 °C für 19 h gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 1,8 l Isopropanol isoliert, fünfmal mit 500 ml Ethanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 11,62 g (35,8 mmol) **MAL-CA 4** (94 %).

$DS_{Ac} = 2,40$; $DS_{MAL} = 0,31$; $DS_{Cl} = 0,07$ (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 51,52; H 5,60; Cl 0,80; N 1,35; gef.: C 50,51; H 5,49; Cl 0,80; N 1,35.

^{13}C -NMR (63 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 172,3$ (C-9); 170,7 (C-15); 169,9– $168,7$ (C-7); 134,2 (C-16); 99,1 (C-1); 75,8– $71,5$ (C-2–5); 61,9 (C-6); 36,7 (C-14); 33,0 (C-10); 27,3 (C-13); 25,3 (C-12); 23,5 (C-11); 20,2 (C-8); 19,9 ppm (C-8).

1H -NMR (250 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 6,9$ (H-16); 5,1– $3,2$ (AGE und H-14); 2,3 (H-10); 2,1– $1,9$ (H-8); 1,5 (H-11 und H-13); 1,3 ppm (H-12).

6-(3-(4-Methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)thio-2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)hexanoylcelluloseacetat (**CUM-CA 1–4**, typisches Beispiel)

Eine Lösung von 500 mg (1,5 mmol) **MAL-CA 4** in 10 ml DMA wurde mit 118 mg (0,6 mmol; 1,25 Äquiv. pro 6-Maleimidohexanoatgruppe) MMC versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei 20 °C für 18 h unter Lichtausschluss gerührt. Das Produkt wurde durch Fällung in 150 ml Isopropanol isoliert, viermal mit 100 ml Ethanol gewaschen und bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 517 mg (1,3 mmol) **CUM-CA 3** (87 %).

$DS_{Ac} = 2,40$; $DS_{MAL} + DS_{DOP} = 0,35$; $MS_{CUM} = 0,29$; $DS_{Cl} = 0,06$ (bestimmt durch EA).

EA kalk. (%): C 53,35; H 5,39; Cl 0,58; N 1,27; S 2,43; gef.: C 52,66; H 5,29; Cl 0,58; N 1,27; S 2,43.

^{13}C -NMR (63 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 175,0$ (C-23); 174,2 (C-26); 172,2 (C-17); 169,9–168,9 (C-7); 159,0 (C-32); 152,9 (C-30); 152,4 (C-32a); 138,2 (C-27); 125,4 (C-28 und C-29); 118,3 (C-29a); 116,8 (C-33); 114,0 (C-31); 99,1 (C-1); 75,7–71,4 (C-2–5); 62,1 (C-6); 42,1 (C-25); 38,0 (C-24); 35,7 (C-22); 32,9 (C-18); 26,4 (C-21); 25,3 (C-20); 23,5 (C-19); 20,2 (C-8); 19,9 (C-8); 17,6 ppm (C-34).

1H -NMR (250 MHz; DMSO- d_6 ; 60 °C): $\delta = 7,8$ (H-29); 7,5 (H-28 und H-33); 6,4 (H-31); 5,1–3,4 (AGE, H-22, H-24 und H-25); 2,3 (H-10); 2,0 (H-8); 1,5 ppm (H-19, H-20 und H-21).

Teil IV.

Anhang

Literatur

- [1] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904–2074.
- [2] J. Lei, H. Ju, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2122–2134.
- [3] K. M. Lee, K. H. Kim, H. Yoon, H. Kim, *Polymers* **2018**, *10*, 551.
- [4] S. Zhang, T.-T. Ong, S.-C. Ng, H. S. On Chan, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 5487–5490.
- [5] M. Elsabahy, K. L. Wooley, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2545–2561.
- [6] G. A. Posthuma-Trumpie, J. Korf, A. van Amerongen, *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 569–582.
- [7] I. Y. Goryacheva, P. Lenain, S. De Saeger, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2013**, *46*, 30–43.
- [8] M. Sajid, A.-N. Kawde, M. Daud, *J. Saudi Chem. Soc.* **2015**, *19*, 689–705.
- [9] D. Quesada-González, A. Merkoçi, *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *73*, 47–63.
- [10] A. Basu, K. R. Kunduru, E. Abtew, A. J. Domb, *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26*, 1396–1412.
- [11] S. Mizrahy, D. Peer, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2623–2640.
- [12] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou, Z. Zhang, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1650–1662.
- [13] F. Seidi, R. Jenjob, T. Phakkeeree, D. Crespy, *J. Controlled Release* **2018**, *284*, 188–212.
- [14] X. Yang, X. Shi, R. D’arcy, N. Tirelli, G. Zhai, *J. Controlled Release* **2018**, *272*, 114–144.
- [15] D. Klemm, F. Kramer, S. Moritz, T. Lindström, M. Ankerfors, D. Gray, A. Dorris, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 5438–5466.
- [16] R. J. Moon, A. Martini, J. Nairn, J. Simonsen, J. Youngblood, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 3941–3994.
- [17] T. Heinze, T. Liebert, A. Koschella, *Esterification of Polysaccharides*, 1. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, **2006**.

- [18] T. Heinze, O. A. El Seoud, A. Koschella, *Cellulose Derivatives, Synthesis, Structure, and Properties*, 1. Aufl., Springer International Publishing, **2018**.
- [19] K. Letchford, H. Burt, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *65*, 259–269.
- [20] E. Roduner, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 583–592.
- [21] W. G. Kreyling, M. Semmler-Behnke, Q. Chaudhry, *Nano Today* **2010**, *5*, 165–168.
- [22] J. V. Alemán, A. V. Chadwick, J. He, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kratochvíl, I. Meisel, I. Mita, G. Moad, S. Penczek, R. F. T. Stepto, *Pure Appl. Chem.* **2007**, *79*, 1801–1829.
- [23] L. E. Euliss, J. A. DuPont, S. Gratton, J. DeSimone, *Chem. Soc. Rev.* **2006**, *35*, 1095–1104.
- [24] N. Anton, J.-P. Benoit, P. Saulnier, *J. Controlled Release* **2008**, *128*, 185–199.
- [25] J. P. Rao, K. E. Geckeler, *Prog. Polym. Sci.* **2011**, *36*, 887–913.
- [26] D. A. Tomalia, *J. Nanopart. Res.* **2009**, *11*, 1251–1310.
- [27] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, J. Lyklema, *Pure Appl. Chem.* **2005**, *77*, 1753–1805.
- [28] L. Zhang, F. Gu, J. Chan, A. Wang, R. Langer, O. Farokhzad, *Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *83*, 761–769.
- [29] R. Hidalgo-Álvarez, A. Martín, A. Fernández, D. Bastos, F. Martínez, F. J. de las Nieves, *Adv. Colloid Interface Sci.* **1996**, *67*, 1–118.
- [30] C. Vauthier, K. Bouchemal, *Pharm. Res.* **2009**, *26*, 1025–1058.
- [31] Y. Habibi, L. A. Lucia, O. J. Rojas, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 3479–3500.
- [32] T. Heinze, K. Petzold, S. Hornig, *Cellul. Chem. Technol.* **2007**, *41*, 13–18.
- [33] C. Lemarchand, R. Gref, P. Couvreur, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 327–341.
- [34] K. Zhao, T. G. Mason, *Rep. Prog. Phys.* **2018**, *81*, 126601.
- [35] D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 4330–4361.
- [36] S. Köstler, V. Ribitsch, „Synthetic Approaches to Organic Nanoparticles“ in *Nanotechnologies for the Life Sciences* (Hrsg.: C. S. Kumar), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2012**, S. 187–219.
- [37] S. S. Su, I. Chang, „Review of Production Routes of Nanomaterials“ in *Commercialization of Nanotechnologies – A Case Study Approach* (Hrsg.: D. Brabazon, E. Pellicer, F. Zivic, J. Sort, M. D. Baró, N. Grujovic, K.-L. Choy), Springer International Publishing, **2018**, S. 15–29.

-
- [38] R. J. Frank-Finney, M. Gupta, *Langmuir* **2016**, *32*, 11014–11020.
- [39] H. Wondraczek, K. Petzold-Welcke, P. Fardim, T. Heinze, *Cellulose* **2013**, *20*, 751–760.
- [40] S. Schubert, J. J. T. Delaney, U. S. Schubert, *Soft Matter* **2011**, *7*, 1581–1588.
- [41] L. Chronopoulou, I. Fratoddi, C. Palocci, I. Venditti, M. V. Russo, *Langmuir* **2009**, *25*, 11940–11946.
- [42] J. Aubry, F. Ganachaud, J.-P. Cohen Addad, B. Cabane, *Langmuir* **2009**, *25*, 1970–1979.
- [43] S. Hornig, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 1487–1492.
- [44] J. Bteich, S. A. McManus, M. J. Ernsting, M. Z. Mohammed, R. K. Prud'homme, K. K. Sokoll, *Mol. Pharmaceutics* **2017**, *14*, 3998–4007.
- [45] E. Lepeltier, C. Bourgaux, P. Couvreur, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2014**, *71*, 86–97.
- [46] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, S. Benita, *Int. J. Pharm.* **1989**, *55*, R1–R4.
- [47] A. M. Bocek, L. M. Kalyuzhnaya, *Russ. J. Appl. Chem.* **2002**, *75*, 989–993.
- [48] M. J. Ernsting, W.-L. Tang, N. MacCallum, S.-D. Li, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2474–2486.
- [49] H. Ibrahim, C. Bindschaedler, E. Doelker, P. Buri, R. Gurny, *Int. J. Pharm.* **1991**, *77*, 211–219.
- [50] P. Roxin, A. Karlsson, S. K. Singh, *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1025–1041.
- [51] J. B. Hall, M. A. Dobrovolskaia, A. K. Patri, S. E. McNeil, *Nanomedicine* **2007**, *2*, 789–803.
- [52] J. Stetefeld, S. A. McKenna, T. R. Patel, *Biophys. Rev.* **2016**, *8*, 409–427.
- [53] B. N. Khlebtsov, N. G. Khlebtsov, *Colloid J.* **2011**, *73*, 118–127.
- [54] S. Bhattacharjee, *J. Controlled Release* **2016**, *235*, 337–351.
- [55] D. E. Koppel, *J. Chem. Phys.* **1972**, *57*, 4814–4820.
- [56] J. Liu, *J. Electron Microsc.* **2005**, *54*, 251–278.
- [57] J. J. Crassous, M. Ballauff, M. Drechsler, J. Schmidt, Y. Talmon, *Langmuir* **2006**, *22*, 2403–2406.
- [58] P. A. Hassan, S. Rana, G. Verma, *Langmuir* **2015**, *31*, 3–12.
- [59] F. Gambinossi, S. E. Mylon, J. K. Ferri, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *222*, 332–349.

- [60] M. Zembala, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2004**, *112*, 59–92.
- [61] T. L. Doane, C.-H. Chuang, R. J. Hill, C. Burda, *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 317–326.
- [62] J. Lyklema, „Electrokinetics and Related Phenomena“ in *Fundamentals of Interface and Colloid Science, Bd. 2*, Academic Press, **1995**, Kap. 4, S. 4.1–4.135.
- [63] J. Lyklema, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2010**, *15*, 125–130.
- [64] A. A. Kamel, C. M. Ma, M. S. El-Aasser, F. J. Micalé, J. W. Vanderhoff, *J. Dispersion Sci. Technol.* **1981**, *2*, 315–330.
- [65] P. Vera, V. Gallardo, J. Salcedo, M. A. Ruiz, A. V. Delgado, *J. Appl. Polym. Sci.* **1997**, *65*, 2721–2726.
- [66] J. E. Seebergh, J. C. Berg, *Colloids Surf. A* **1995**, *100*, 139–153.
- [67] S. Slomkowski, J. V. Alemán, R. G. Gilbert, M. Hess, K. Horie, R. G. Jones, P. Kubisa, I. Meisel, W. Mormann, S. Penczek, R. F. T. Stepto, *Pure Appl. Chem.* **2011**, *83*, 2229–2259.
- [68] M. Nikolajski, J. Wotschadlo, J. H. Clement, T. Heinze, *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 920–925.
- [69] V. B. Vedula, M. Chopra, E. Joseph, S. Mazumder, *Appl. Nanosci.* **2016**, *6*, 197–208.
- [70] S. Mazumder, A. K. Dewangan, N. Pavurala, *Asian J. Pharm. Sci.* **2017**, *12*, 532–541.
- [71] A. A. Date, A. Shibata, E. McMullen, K. La Bruzzo, P. Bruck, M. Belshan, Y. Zhou, C. J. Destache, *J. Biomed. Nanotechnol.* **2015**, *11*, 416–427.
- [72] S. Mandal, K. Khandalavala, R. Pham, P. Bruck, M. Varghese, A. Kochvar, A. Monaco, P. K. Prathipati, C. Destache, A. Shibata, *Polymers* **2017**, *9*, 17.
- [73] Y. Yang, A. Roy, Y. C. Zhao, E. Undzys, S. D. Li, *Bioconjugate Chem.* **2017**, *28*, 1505–1518.
- [74] A. Roy, Y. C. Zhao, Y. Yang, A. Szeitz, T. Klassen, S. D. Li, *Biomaterials* **2017**, *137*, 11–22.
- [75] F. F. Sahle, C. Gerecke, B. Kleuser, R. Bodmeier, *Int. J. Pharm.* **2017**, *516*, 21–31.
- [76] M. Chopra, R. Jain, A. Dewangan, S. Varkey, S. Mazumder, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *16*, 9432–9442.
- [77] A. K. Dewangan, Y. Perumal, N. Pavurala, K. Chopra, S. Mazumder, *J. Drug Delivery Sci. Technol.* **2017**, *41*, 269–279.

-
- [78] I. L. Liakos, F. D’autilia, A. Garzoni, C. Bonferoni, A. Scarpellini, V. Brunetti, R. Carzino, P. Bianchini, P. P. Pompa, A. Athanassiou, *Int. J. Pharm.* **2016**, *510*, 508–515.
- [79] M. Amin, N. S. Abbas, M. A. Hussain, K. J. Edgar, M. N. Tahir, W. Tremel, M. Sher, *Cellulose* **2015**, *22*, 2011–2022.
- [80] B. Balzus, F. F. Sahle, S. Honzke, C. Gerecke, F. Schumacher, S. Hedtrich, B. Kleuser, R. Bodmeier, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *115*, 122–130.
- [81] N. R. Ravikumara, B. Madhusudhan, T. S. Nagaraj, S. R. Hiremat, G. Raina, *J. Biomater. Appl.* **2009**, *24*, 47–64.
- [82] S. E. El-Habashy, A. N. Allam, A. H. El-Kamel, *Int. J. Nanomed.* **2016**, *11*, 2369–2380.
- [83] S. Duarah, R. D. Durai, V. B. Narayanan, *Drug Delivery Transl. Res.* **2017**, *7*, 750–760.
- [84] G. Saravanakumar, D.-G. Jo, J. H. Park, *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 3212–3229.
- [85] M. Swierczewska, H. S. Han, K. Kim, J. H. Park, S. Lee, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2016**, *99*, 70–84.
- [86] A. Schulz, S. Hornig, T. Liebert, E. Birckner, T. Heinze, G. J. Mohr, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 1884–1889.
- [87] S. Hornig, C. Biskup, A. Grafe, J. Wotschadlo, T. Liebert, G. J. Mohr, T. Heinze, *Soft Matter* **2008**, *4*, 1169–1172.
- [88] R. J. Davies, S. S. Eapen, S. J. Carlisle, „Lateral-Flow Immunochromatographic Assays“ in *Handbook of Biosensors and Biochips* (Hrsg.: R. S. Marks, D. C. Cullen, I. Karube, C. R. Lowe, H. H. Weetall), John Wiley & Sons, Ltd, **2008**, Kap. 74, S. 1–15.
- [89] M. P. A. Laitinen, M. Vuento, *Biosens. Bioelectron.* **1996**, *11*, 1207–1214.
- [90] J. Aveyard, M. Mehrabi, A. Cossins, H. Braven, R. Wilson, *Chem. Commun.* **2007**, 4251–4253.
- [91] K. Henderson, J. Stewart, *J. Immunol. Methods* **2002**, *270*, 77–84.
- [92] Y. Shiomi, T. Matsui, M. Doi (Asahi Kasei Fibers Corp), EP 2261261, **2010**.
- [93] S. Yoshida, Y. Shiomi, T. Matsui, M. Doi, N. Mimura, T. Matsuse (Asahi Kasei Fibers Corp), EP 2503337, **2012**.
- [94] T. Heinze, T. Liebert, K. Pfeiffer, M. Hussain, *Cellulose* **2003**, *10*, 283–296.
- [95] E. Haslam, *Tetrahedron* **1980**, *36*, 2409–2433.
- [96] B. Neises, W. Steglich, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522–524.

- [97] G. Höfle, W. Steglich, H. Vorbrüggen, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 569–583.
- [98] E. Vowinkel, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 16–22.
- [99] G. Samaranayake, W. G. Glasser, *Carbohydr. Polym.* **1993**, *22*, 1–7.
- [100] C. H. Bamford, I. P. Middleton, K. G. Al-Lamee, *Polymer* **1986**, *27*, 1981–1985.
- [101] A. H. Fenselau, J. G. Moffatt, *J. Am. Chem. Soc.* **1966**, *88*, 1762–1765.
- [102] S. L. Williamson, C. L. McCormick, *J. Macromol. Sci. Part A* **1998**, *35*, 1915–1927.
- [103] P. A. Stadler, *Helv. Chim. Acta* **1978**, *61*, 1675–1681.
- [104] M. Hussain, T. Liebert, T. Heinze, *Polym. News* **2004**, *29*, 14–17.
- [105] M. A. Hussain, T. Heinze, *Polym. Bull.* **2008**, *60*, 775.
- [106] M. Zhou, T. Liebert, R. Müller, A. Dellith, C. Gräfe, J. H. Clement, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 2308–2315.
- [107] T. Liebert, J. Wotschadlo, P. Laudeley, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3107–3113.
- [108] M. A. Hussain, T. Liebert, T. Heinze, *Macromol. Rapid Commun.* **2004**, *25*, 916–920.
- [109] J. E. Sealey, G. Samaranayake, J. G. Todd, W. G. Glasser, *J. Polym. Sci. Part B* **1996**, *34*, 1613–1620.
- [110] A. Koschella, G. Haucke, T. Heinze, *Polym. Bull.* **1997**, *39*, 597–604.
- [111] W. G. Glasser, U. Becker, J. G. Todd, *Carbohydr. Polym.* **2000**, *42*, 393–400.
- [112] D. Gräbner, T. Liebert, T. Heinze, *Cellulose* **2002**, *9*, 193–201.
- [113] M. A. Hussain, *J. Polym. Sci. Part A* **2008**, *46*, 747–752.
- [114] M. Sánchez-Chaves, F. Arranz, *Polymer* **1997**, *38*, 2501–2505.
- [115] T. Heinze, J. Schaller, *Macromol. Chem. Phys.* **2000**, *201*, 1214–1218.
- [116] E. Aschenbrenner, K. Bley, K. Koynov, M. Makowski, M. Kappl, K. Landfester, C. K. Weiss, *Langmuir* **2013**, *29*, 8845–8855.
- [117] M. R. Kulterer, M. Reischl, V. E. Reichel, S. Hribernik, M. Wu, S. Köstler, R. Kargl, V. Ribitsch, *Colloids Surf. A* **2011**, *375*, 23–29.
- [118] A. Garg, G. Rai, S. Lodhi, A. P. Jain, A. K. Yadav, *Drug Delivery* **2016**, *23*, 1525–1535.
- [119] T. Musumeci, C. A. Ventura, I. Giannone, B. Ruozi, L. Montenegro, R. Pignatello, G. Puglisi, *Int. J. Pharm.* **2006**, *325*, 172–179.

-
- [120] Physical/Chemical Property Database (PHYSPROP), <http://esc.syrres.com/fatepointer/search.asp> (besucht am 01.02.2016).
- [121] M. S. Zakerhamidi, S. Golghasemi Sorkhabi, A. N. Shamkhali, *Spectrochim. Acta Part A* **2014**, *127*, 340–348.
- [122] G. L. Eakins, M. W. Cooper, N. N. Gerasimchuk, T. J. Phillips, B. E. Breyfogle, C. J. Stearman, *Can. J. Chem.* **2013**, *91*, 1059–1071.
- [123] G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2. Aufl., Elsevier, **2008**.
- [124] *Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions: Concepts and Applications* (Hrsg.: W. R. Algar, P. E. Dawson, I. L. Medintz), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2017**.
- [125] S. L. Tang, A. J. McGhie, *Langmuir* **1996**, *12*, 1088–1093.
- [126] J. M. Peula, R. Hidalgo-Alvarez, F. J. de las Nieves, *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *201*, 132–138.
- [127] D. Rath, S. Panda, *Chem. Eng. J.* **2015**, *260*, 657–670.
- [128] J. A. Molina-Bolívar, F. Galisteo-González, *J. Macromol. Sci. Part C* **2005**, *45*, 59–98.
- [129] Y. K. Oh, H.-A. Joung, H. S. Han, H.-J. Suk, M.-G. Kim, *Biosens. Bioelectron.* **2014**, *61*, 285–289.
- [130] S. McWilliam, A. Riordan, *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **2010**, *95*, 55.
- [131] D. H. Choi, S. K. Lee, Y. K. Oh, B. W. Bae, S. D. Lee, S. Kim, Y.-B. Shin, M.-G. Kim, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, *25*, 1999–2002.
- [132] A. Barré, M.-L. Tîntaş, V. Levacher, C. Papamicaël, V. Gembus, *Synthesis* **2017**, *49*, 472–483.
- [133] A. Das, P. Theato, *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 1434–1495.
- [134] L. Fan, M. Cao, S. Gao, T. Wang, H. Wu, M. Peng, X. Zhou, M. Nie, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93*, 380–385.
- [135] L. Fan, M. Peng, X. Zhou, H. Wu, J. Hu, W. Xie, S. Liu, *Carbohydr. Polym.* **2014**, *112*, 32–38.
- [136] Z. Tian, L. Zhang, G. Shi, X. Sang, C. Ni, *J. Appl. Polym. Sci.* **2018**, *135*, 46577.
- [137] M. Sakamoto, H. Tseng, K.-i. Furuhata, *Carbohydr. Res.* **1994**, *265*, 271–280.
- [138] T. Satoh, H. Kano, M. Nakatani, N. Sakairi, S. Shinkai, T. Nagasaki, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 2406–2413.
- [139] C. Gao, S. Liu, K. J. Edgar, *Carbohydr. Polym.* **2018**, *193*, 108–118.

- [140] H. Ogura, T. Kobayashi, K. Shimizu, K. Kawabe, K. Takeda, *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4745–4746.
- [141] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827–10852.
- [142] K. Takeda, I. Sawada, A. Suzuki, H. Ogura, *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4451–4454.
- [143] C. Y. Lim, N. A. Owens, R. D. Wampler, Y. Ying, J. H. Granger, M. D. Porter, M. Takahashi, K. Shimazu, *Langmuir* **2014**, *30*, 12868–12878.
- [144] T. M. Postma, W. R. J. D. Galloway, F. B. L. Cougnon, G. D. Pantoş, J. E. Stokes, D. R. Spring, *Synlett* **2013**, *24*, 765–769.
- [145] H. Wondraczek, T. Elschner, T. Heinze, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *83*, 1112–1118.
- [146] T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima, *J. Chem. Phys.* **1958**, *29*, 611–616.
- [147] W. A. Wani, M. Shahid, A. Hussain, M. F. AlAjmi, *Fluorescent Organic Nanoparticles, New Generation Materials with Diverse Analytical and Bio-medical Applications*, 1. Aufl., Springer Singapore, **2018**.
- [148] R. Cui, H. Huang, Z. Yin, D. Gao, J.-J. Zhu, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23*, 1666–1673.
- [149] N. C. Veitch, A. T. Smith, *Adv. Inorg. Chem.* **2000**, *51*, 107–162.
- [150] F. W. Krainer, A. Glieder, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 1611–1625.
- [151] A. Frey, B. Meckelein, D. Externest, M. A. Schmidt, *J. Immunol. Methods* **2000**, *233*, 47–56.
- [152] R. K. Iha, K. L. Wooley, A. M. Nyström, D. J. Burke, M. J. Kade, C. J. Hawker, *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 5620–5686.
- [153] C. García-Astrain, K. González, T. Gurrea, O. Guaresti, I. Algar, A. Eceiza, N. Gabilondo, *Carbohydr. Polym.* **2016**, *149*, 94–101.
- [154] J.-M. Malho, J. Brand, G. Pecastaings, J. Ruokolainen, A. Gröschel, G. Sèbe, E. Garanger, S. Lecommandoux, *ACS Macro Lett.* **2018**, *7*, 646–650.
- [155] J. R. G. Navarro, G. Conzatti, Y. Yu, A. B. Fall, R. Mathew, M. Edén, L. Bergström, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 1293–1300.
- [156] E. Trovatti, A. G. Cunha, A. J. F. Carvalho, A. Gandini, *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *95*, 762–768.
- [157] A. S. Abdel-Naby, A. A. Al-Ghamdi, *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *68*, 21–27.
- [158] M. Azechi, N. Toyota, K. Yamabuki, K. Onimura, T. Oishi, *Polym. Bull.* **2011**, *67*, 631–640.

-
- [159] T. Elschner, F. Obst, K. Stana-Kleinschek, R. Kargl, T. Heinze, *Carbohydr. Polym.* **2017**, *161*, 1–9.
- [160] T. Elschner, F. Obst, T. Heinze, R. Kargl, K. Stana Kleinschek, *Macromol. Chem. Phys.* **2017**, *218*, 1600535.
- [161] T. Elschner, F. Obst, T. Heinze, *Macromol. Biosci.* **2018**, *18*, 1800258.
- [162] P. Mison, B. Sillion, „Thermosetting Oligomers Containing Maleimides and Nadimides End-Groups“ in *Progress in Polyimide Chemistry I* (Hrsg.: H. R. Kricheldorf), Springer Berlin Heidelberg, **1999**, S. 137–179.
- [163] T. Woldbæk, P. Klaboe, C. J. Nielsen, *J. Mol. Struct.* **1975**, *27*, 283–301.
- [164] A. J. Barnes, L. Le Gall, C. Madec, J. Lauransan, *J. Mol. Struct.* **1977**, *38*, 109–120.
- [165] R. M. de Figueiredo, P. Oczipka, R. Fröhlich, M. Christmann, *Synthesis* **2008**, 1316–1318.
- [166] A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36.
- [167] A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2014**, *5*, 4820–4870.
- [168] B. H. Northrop, S. H. Frayne, U. Choudhary, *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 3415–3430.
- [169] D. P. Nair, M. Podgórski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chem. Mater.* **2014**, *26*, 724–744.
- [170] M. Tanaka, T. Kai, X.-L. Sun, H. Takayanagi, Y. Uda, K. Furuhata, *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1844–1848.
- [171] E. Karakaş Sarıkaya, Ö. Dereli, Y. Erdoğan, M. T. Güllüoğlu, *J. Mol. Struct.* **2013**, *1049*, 220–226.
- [172] A. E. Lanterna, M. González-Béjar, M. Frenette, J. C. Scaiano, *Photochem. Photobiol. Sci.* **2017**, *16*, 1284–1289.
- [173] H. Wondraczek, A. Kotiaho, M. Niemi, P. Fardim, T. Heinze, *Carbohydr. Polym.* **2013**, *97*, 45–51.
- [174] M. N. Merzlyak, K. Razi Naqvi, *J. Photochem. Photobiol. B* **2000**, *58*, 123–129.
- [175] M. Babin, D. Stramski, *Limnol. Oceanogr.* **2002**, *47*, 911–915.
- [176] T. Heinze, K. Schwikal, S. Barthel, *Macromol. Biosci.* **2005**, *5*, 520–525.
- [177] T. F. Liebert, T. Heinze, *Biomacromolecules* **2004**, *6*, 333–340.
- [178] J. W. A. Findlay, R. F. Dillard, *AAPS J.* **2007**, *9*, E260–E267.

Publikationsliste

Veröffentlichungen in *Peer Reviewed Journals*

3. *Nanoparticles based on hydrophobic polysaccharide derivatives – Self-assembling principles, characterization techniques, and biomedical applications*
Martin Gericke, Peter Schulze, Thomas Heinze, *Macromol. Biosci.*, eingereicht.
2. *Reactive nanoparticles with activated ester moieties from cellulose acetate phthalate derivatives*
Peter Schulze, Martin Gericke, Thomas Heinze, *Cellulose* **2019**, 26, 475–490.
1. *Incorporation of Hydrophobic Dyes within Cellulose Acetate and Acetate Phthalate Based Nanoparticles*
Peter Schulze, Martin Gericke, Friedrich Scholz, Holger Wondraczek, Peter Miethe, Thomas Heinze, *Macromol. Chem. Phys.* **2016**, 217, 1823–1833.

Vorträge

Dye functionalized polysaccharide nanoparticles – From synthesis to bio-sensor applications in immunoassays
Peter Schulze, Martin Gericke*, Friedrich Scholz, Peter Miethe, Thomas Heinze
253rd National Meeting & Exposition, American Chemical Society, San Francisco, CA, US, 02.–06. April 2017

Poster

Incorporation of hydrophobic compounds within functional polysaccharide nanoparticles – From principles to immunoassay applications
Peter Schulze, Martin Gericke*, Friedrich Scholz, Peter Miethe, Thomas Heinze
5th International Polysaccharide Conference, EPNOE2017, Jena, Deutschland, 20.–24. August 2017

*Redner

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Betreuer Prof. Dr. Thomas Heinze, der mir die Möglichkeit gab in seiner Arbeitsgruppe an diesem anwendungsorientierten Thema forschen zu dürfen und meine Doktorarbeit anzufertigen. Mit seiner Unterstützung und konstruktiven Diskussionen, aber auch mit Ressourcen und Freiraum, die er mir zur Verfügung stellte, schuf er den Rahmen für den Erfolg dieser Arbeit.

An zweiter Stelle gilt mein Dank Dr. Martin Gericke, der mir in unermüdlicher Geduld mit Ratschlägen, Kritik sowie Ideen zur Seite stand und mir half, mich stetig zu verbessern.

Natürlich bin ich auch allen anderen Kollegen des *Kompetenzzentrums für Polysaccharidforschung* an der *Friedrich-Schiller-Universität Jena* dankbar, vor allem Dr. Christian Achtel, Sascha Blohm und Dr. Konrad Hotzel für die fachlichen Anregungen und den Spaß abseits des Laboralltags sowie Annett Pfeiffer, Antje Tied, Peggy Laudeley, Dr. Thomas Elschner, Dr. Hendryk Würfel, Dr. Holger Wondraczek und Dr. Andreas Koschella für die fortwährende Hilfe und den Erfahrungsschatz, den ihr mit mir geteilt habt.

Dem technischen Personal des *Instituts für organische Chemie und makromolekulare Chemie*, insbesondere Dr. Peter Bellstedt, Dr. Wolfgang Günther, Beate Sentis, Friederike Pielenz, Beate Lentvogt und Sandra Köhn, verdanke ich erstklassige Messergebnisse und dass sie immer ein offenes Ohr für jeden meiner Sonderwünsche hatten.

Ich danke Dr. Friedrich Scholz für die erfolgreiche Zusammenarbeit und Hilfe zu allen Belangen der Immunschnelltests sowie Steffi Stumpf, Dr. Moritz von der Lühse und Dr. Stephanie Höppener für elektronenmikroskopische Messungen.

Ich bedanke mich darüber hinaus bei Dr. Peter Miethe und den Kollegen des *Forschungszentrums für Biotechnologie und Medizintechnik GmbH* für die gute Kooperation von Firma und Universität, in der es mir möglich war Forschungsergebnisse in die Anwendung zu übertragen.

Prof. Dr. Felix Schacher danke ich für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Zuletzt spreche ich meine tiefe Dankbarkeit meinen Freunden, meiner Familie und meiner Freundin aus. Danke für euer Verständnis, eure Liebe und die schönen Momente in meinem Leben!

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen angefertigt habe.

Ort, Datum

Peter Schulze